

博士論文

和漢薬による生体バリア機能制御と炎症性疾患への  
治療応用に関する研究

2020 年度

富山大学大学院 医学薬学教育部 薬科学専攻

和漢医薬学総合研究所 生体防御学領域

梅山 凜

## 目次

第1章 研究目的とその背景.....	2
第2章 Toll 様受容体を介した炎症性シグナルに対する桑白皮エキスの効果.....	7
第1節 序論	
第2節 Toll 様受容体リガンド刺激による NF- $\kappa$ B および MAPK シグナル経路活性化に対する桑白皮エキスの効果	
第3節 Toll 様受容体リガンド刺激で誘導される炎症関連反応に対する桑白皮エキスの効果	
第4節 Toll 様受容体を介した NF- $\kappa$ B シグナル経路活性化に対する Moracin O, Moracin P の効果	
第5節 まとめ	
第3章 炎症性皮膚疾患モデルに対する和漢薬の有用性.....	23
第1節 序論	
第2節 Imiquimod 誘発マウス乾癬モデルの作製	
第3節 Imiquimod 誘発乾癬症状に対する桑白皮エキスの局所作用	
第4節 脾臓における IL-17A 産生 T 細胞に対する桑白皮エキスの効果	
第5節 炎症性皮膚疾患モデルに対する発酵性玄米 (FBRA) の効果	
第6節 まとめ	
第4章 総括と展望.....	49
謝辞.....	54
引用文献.....	55

## 第1章 研究目的とその背景

### はじめに

炎症反応は生体防御を担う免疫応答であり、病原性微生物の感染や化学物質などの外的ストレス、組織損傷・組織機能不全等の異常に対して生じ、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている(1, 2)。炎症は大きく急性炎症と慢性炎症に分類される。通常、急性炎症は外部刺激や原因物質の除去、損傷組織の修復に伴い速やかに収束・寛解していくが、一方で慢性炎症は急性炎症により原因物質が除去された後も様々な要因から炎症が持続する事で起こる(3)。くわえて、本来無害な刺激に対し過剰・過敏に炎症反応が生じることもあり、このような病的な炎症は生体に有害な作用をもたらすことも知られている。近年、がんや糖尿病、認知症などの神経変性疾患、自己免疫疾患など多くの加齢性疾患の発症や悪性化における慢性炎症の重要性が明らかとなってきた(4-6)。これら加齢性疾患の罹患率は人口の高齢化に伴い増加の一途を辿っており、慢性炎症を適切に制御することは今後益々重要になると考えられる (Figure 1-1)。

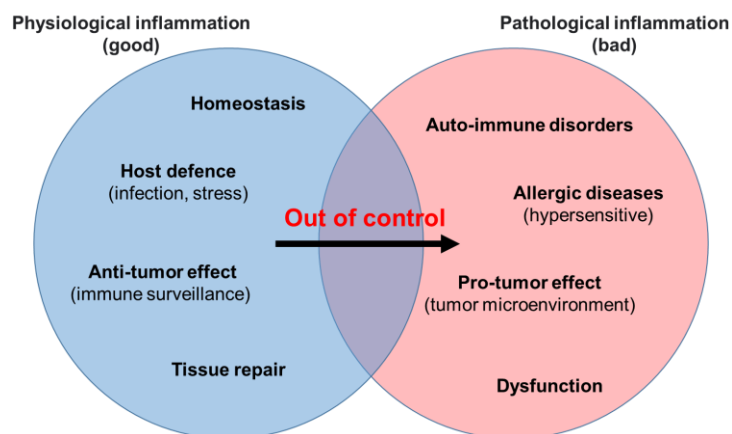


Figure 1-1. 炎症反応の二面性

## 自然免疫および炎症性シグナル経路制御の重要性

免疫反応は自然免疫系と獲得免疫系の二つの過程に大別される。自然免疫系はマクロファージや樹状細胞、好中球などによる細菌やウイルス等の“非自己”認識(貪食作用)によって異物の迅速な排除に関与する一方で、獲得免疫系は主に T 細胞や B 細胞による抗原特異的な強力かつ持続的な免疫応答を誘導する。また、獲得免疫系は高等脊椎動物に特徴的な遺伝子再構成による多様性を有する一方で、自然免疫系は、ほとんど全ての多細胞生物に広く存在する原始的な免疫系であり、獲得免疫と比較すると非特異的な応答であると考えられていたため、獲得免疫系に関する研究が免疫学の主流であった(7)。しかし 1996 年に Hoffmann らにより Toll 様受容体 (TLR) が発見されたことを契機とし、自然免疫系の重要性が再注目されてきた。その後の研究から、自然免疫系を担う細胞の表面には TLR を含むパターン認識受容体が発現しており、それら受容体を介しそれぞれ異なる病原体の成分を認識することが明らかとなった(7)。また、自然免疫応答により活性化されたマクロファージや樹状細胞による抗原提示、サイトカイン産生などは、T 細胞応答をはじめとする獲得免疫系の活性化にも重要であることから、現在ではこれら自然免疫系と獲得免疫系の相互連携の重要性が広く認識されている(8-10)。さらに、近年ではパターン認識受容体が病原体由来成分(病原体関連分子パターン:PAMPs)のみならず、細胞傷害や細胞死に伴い放出される自己由来成分(ダメージ関連分子パターン:DAMPs)を認識することが明らかとなり、自然免疫系は単に異物の認識・除去を行うだけではなく、生体の恒常性維持にも重要な役割を担っていることが明らかとなった(11-13)。このように自然免疫系の生体防御機構における役割が解明されていくに従い、自然免疫の異常を原因とする疾患も数多く報告されている。例えば、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチでは、TLR の活性化が炎症性サイトカインや自己抗体の産生誘導に関与しており、その結果、自己組織の破壊・障害が起こると考えられ

ている(14)。また、獲得免疫の始動に自然免疫系の活性化が必須であることから、これまで獲得免疫の異常と考えられてきた炎症性疾患の多くも自然免疫系の制御が重要であると認識されている(Figure 1-2)(15-17)。

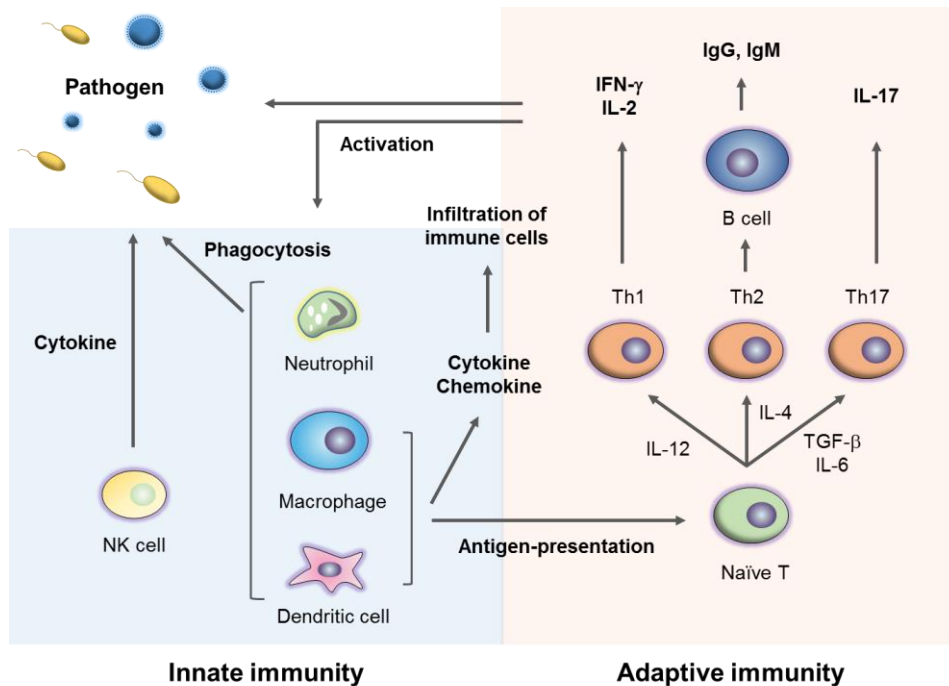


Figure 1-2. 自然免疫と獲得免疫の関連性

炎症性免疫応答の惹起や維持には、様々な細胞内での炎症性シグナル経路の活性化が重要となることが明らかとなっている。なかでも Nuclear factor-kappa B (NF-κB) は 1986 年に David Baltimore らによって発見された転写因子であり、炎症反応において特に中心的な役割を果たしている分子である(18)。通常、NF-κB はその阻害物質である IκB と結合した不活性化状態で細胞質に局在しているが、病原体の感染や紫外線など様々な外的刺激により IκB がリン酸化され分解を受けることで活性化される。活性化された NF-κB は核内に移行しリン酸化やアセチル化を受け、

炎症性サイトカインやケモカイン、各種接着分子などの遺伝子の転写を活性化することで、様々な細胞応答を誘導する(19-21)。また、多くのがん細胞において NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が認められることも知られている。このようながん細胞における恒常的な NF- $\kappa$ B 活性化は、Bcl-2 や Bcl-XL 等の抗アポトーシス遺伝子、細胞の生存・増殖に関与する遺伝子の発現を誘導し、腫瘍形成や化学療法に対する耐性獲得に寄与し、さらに炎症性サイトカイン産生や血管新生の促進による炎症性腫瘍微小環境の形成等に重要であることが数多く報告されている(22-26)。また、NF- $\kappa$ B には負のフィードバック機構が備わっていることが明らかとなっており、すなわち炎症の惹起や維持における重要性に加えて、その活性は炎症の収束にも深く関わることから、NF- $\kappa$ B の機能や制御の異常はアレルギー疾患や自己免疫疾患の原因となる。

#### 炎症性疾患に対する和漢薬の有用性

漢方薬をはじめとする和漢薬は、中医学をもとに我が国で独自の発展を遂げた伝統薬であり、個々の体格や体質・症状に合わせ適応される。炎症は漢方医学的には「熱証」の状態ととらえられることから、主に清熱作用の強い和漢薬や生薬が使用され、状態に合わせ滋陰作用を有する生薬を組み合わせ用いられる。現在臨床で炎症性疾患の治療を目的に使用されている漢方製剤には、小青竜湯(アレルギー性鼻炎)、黄连解毒湯(湿疹、アトピー性皮膚炎)、半夏瀉心湯(神経性胃炎、口内炎)などが挙げられる。これらの慢性炎症性疾患の多くは西洋薬による既存治療では根治が難しく、寛解と再燃を繰り返すことが大きな問題となっており、とりわけ炎症性皮膚疾患では炎症の抑制を目的とした治療の大部分はステロイドや免疫抑制薬の外用製剤が用いられる。一方、和漢薬の使用はそれ自身の治療効果を期待するのみならず、既存治療薬の減量も期待できることから、適切な和漢薬の使用が炎症性疾患の治療に期待されている。しかしながら、和漢薬の中には未だその薬理作用や治療効果において、科

学的エビデンスの不十分なものも多く存在し、臨床での適応が困難であるケースもある。それ故、和漢薬の作用機序や薬理作用を理解することは、これらを利用した炎症性疾患に対する新規治療に応用する上で非常に重要となる。

先行研究の成果から、和漢薬の桑白皮 (*Morus alba* L. bark) 酢酸エチル抽出エキスが NF- $\kappa$ B 活性化抑制作用を示し、ヒトケラチノサイト由来細胞 HaCaT における NF- $\kappa$ B 誘導性の細胞障害に対して細胞保護効果を示すことを見出した(27)。桑白皮はクワ科クワ属の根皮を乾燥させたもので、去痰・鎮咳・血圧降下・血糖降下作用が知られる生薬である(28-31)。桑白皮を含有する代表的な漢方製剤には清肺湯や五虎湯が挙げられ、これらはいずれも鎮咳・去痰を目的とし重度の咳や気管支喘息の治療に古くから用いられてきた。一方、桑白皮の免疫細胞への影響や炎症性皮膚疾患に対する有用性はほとんど報告されていない。また和漢薬として利用されるうるち米のもみ殻を除去した玄米である粳米 (*Oryza sativa* Linne) も抗炎症作用を有することが報告されている(32, 33)。粳米は麦門冬湯や白虎加人参湯に含まれ、皮膚や咽喉の乾燥に起因する掻痒感および咳嗽に適応を持つ。多くの炎症性皮膚疾患では表皮バリア機能低下に基づく乾燥が症状の悪化に影響するため、滋陰作用を持つとされる粳米や玄米に関連する食品成分はこれら炎症性疾患に対して有用であることが期待できる。

### 本研究の目的

以上の背景から、本研究では自然免疫細胞の活性化に対する桑白皮エキス (*Morus alba* L. bark extract: MabE) の効果を明らかにすることに加え、桑白皮ならびに発酵玄米食品である FBRA (Fermented Blown Rice with *Aspergillus oryzae*) の炎症性皮膚疾患に対する効果を検討することで、これら和漢薬の生体バリア機能制御と炎症性疾患への治療応用における有用性を明らかにすることを目的とした。

## 第2章

### 第1節 序論

マクロファージは感染微生物を貪食し病原体の除去を担う自然免疫細胞であり、樹状細胞とともに、主要な抗原提示細胞として知られている。マクロファージは様々なパターン認識受容体やサイトカイン受容体を発現し、PAMPs や DAMPs の認識を介した炎症の惹起および獲得免疫を誘導することで感染初期の炎症反応に関わるが、一方で炎症の収束や損傷組織修復への関与も明らかとなっており、生体防御機構の恒常性維持に不可欠な役割を果たしていると考えられる(11, 34-36)。代表的なパターン認識受容体である TLR はヒトで 10 種類 (TLR1-10)、マウスで 12 種類 (TLR1-9, 11-13) が知られており、認識するリガンドや細胞内での局在、シグナル伝達に必要な補因子などがそれぞれ異なる (Figure 2-1) (37)。一方、TLR の下流シグナルは共通であり、NF- $\kappa$ B、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や interferon-regulatory factor (IRF) 経路の活性化を介して炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導することで、自然免疫系やそれに続く獲得免疫系を活性化する (37-40)。このように TLR の活性化シグナルは自然免疫系による異物排除に関わる急性炎症応答の惹起に重要であるが、一方でその過剰な、または持続性の活性化は関節リウマチ、乾癬や全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患、喘息等のアレルギー疾患を代表とする様々な慢性炎症性疾患の発症や重症化に関与することが報告されている(15, 41, 42)。つまり、TLR の活性化は生体防御機構としての役割と、炎症性疾患の要因としての二面性を持つため、TLR 活性化シグナルを適切に制御することが重要となる。そこで本章では、TLR 活性化シグナルに対する桑白皮の効果について検討した。



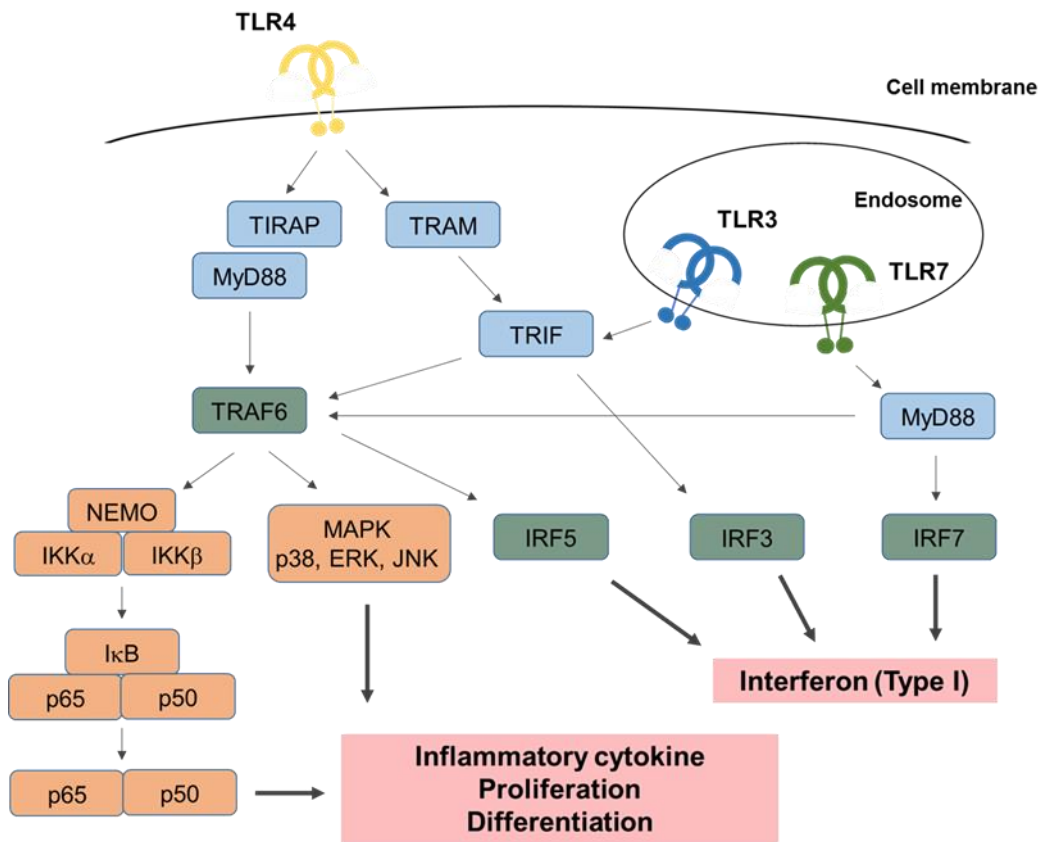


Figure 2-1. TLR-related signaling pathway.

## 第 2 節

### § 1. 目的

マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞は、ほぼ全ての TLR を発現し、各種 TLR リガンドに応答し活性化されることが知られている。本節では TLR による各リガンドの認識を起点とする炎症性シグナルの活性化に対する桑白皮エキス(MabE)の作用、および TLR の種類や特徴による反応性の違いについて明らかとすることを目的とした。RAW264.7 細胞での局在や、活性化に関わる補助因子が異なる TLR として TLR7, 3, 4 に着目し、それぞれのリガンドである Imiquimod (IMQ)、polyI:C、Lipopolysaccharide (LPS) で刺激した際に誘導される NF- $\kappa$ B および MAPK 経路の活性化に対する MabE の効果を検討した。

### § 2. 実験方法

#### 桑白皮抽出エキス

桑白皮 (1 kg) をメタノール (5 L, 90 分) で 2 回還流することでメタノール抽出物を得、これに水 (500 mL) を加え懸濁させた後、n-ヘキサン (500 mL) を加え抽出分離を行った。この操作を 3 回繰り返し得られた水相に、酢酸エチル (500 mL) を加え振とう抽出を 3 回行い、酢酸エチル抽出物 (MabE) を得た。MabE は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させ、50 mg/mL の濃度で -20°C で保存したものを実験に使用した。

#### 細胞培養

マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞および NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子安定発現 RAW264.7 細胞株である RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 細胞(43)は、2 mM L-glutamine、0.2%

NaHCO<sub>3</sub>、100 units/mL penicillin G、100 mg/mL streptomycin および 10% Fetal bovine serum (FBS) 含有 DMEM 培地 (日水、東京、日本) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub>において培養した。

#### 細胞増殖アッセイ

RAW264.7-NFκB-Luc2 細胞を 2×10<sup>4</sup> cells/well となるよう 96 穴プレートに播種し 37°Cで一晩培養したのち、MabE (0, 0.5, 1, 5, 10, 25 μg/mL)を加えた。1 時間後、IMQ (10 μg/mL), polyI:C (10 μg/mL), LPS (10 ng/mL)のそれぞれで刺激し、37°Cで 24 時間培養した。その後、WST-1 試薬(同仁化学)を加え 450 nm の波長で吸光度を測定した。細胞増殖能は未刺激のコントロール群と比較した。

#### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

RAW264.7-NFκB-Luc2 細胞を 5×10<sup>4</sup> cells/well となるよう 96 穴プレートに播種し 37°Cで一晩培養した後、MabE (0, 0.5, 1, 5, 10, 25 μg/mL)を加えた。1 時間後、IMQ (10 μg/mL), polyI:C (10 μg/mL), LPS (10 ng/mL)のそれぞれで刺激し、直後にルシフェリン (300 μg/mL)を加え 6 時間後の発光活性を IVIS LUMINA II (Caliper Life Sciences)にて測定した。

#### 細胞抽出液の調製

RAW264.7 細胞を 1%FBS 含有 DMEM 培地を用いて 1×10<sup>6</sup> cell/well となるよう 6 穴プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。MabE (25 μg/mL)を各 well に加え、1 時間後に IMQ (20 μg/mL), polyI:C (20 μg/mL), LPS (100 ng/mL) でそれぞれ刺激し、37°Cで 3 時間反応させた。余分な培地を除去した後、PBS を

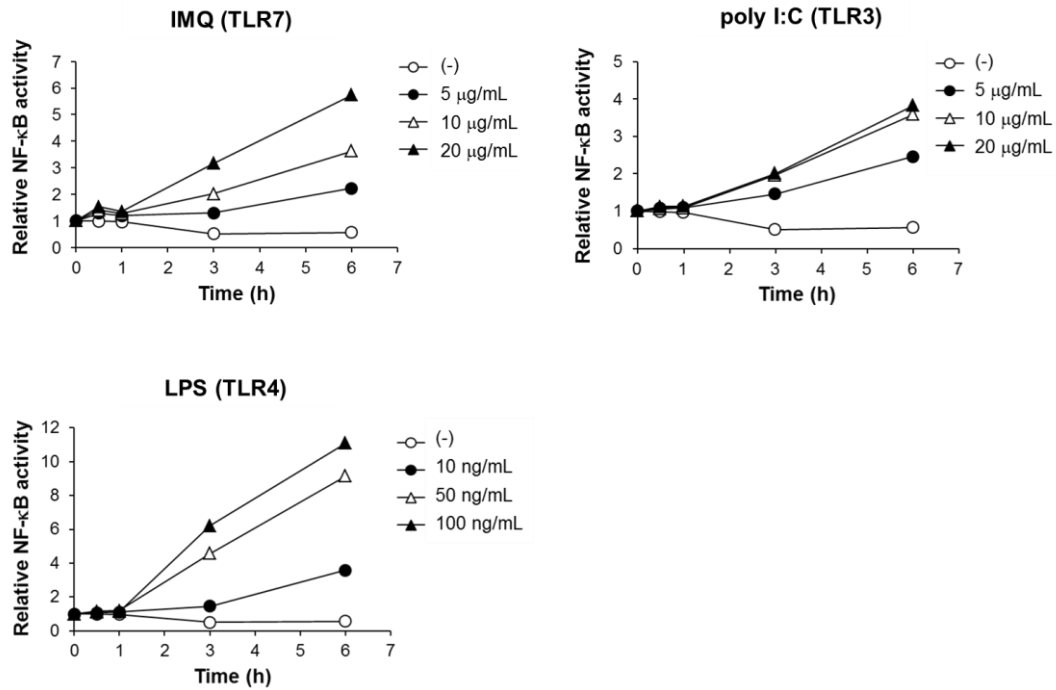
加え細胞を回収し、whole-cell lysis buffer (25 mM HEPES, pH7.7, 300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 20 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin) を用いてタンパクの回収を行い、上清を全細胞抽出液とした。

#### ウェスタンブロット法によるタンパク発現解析

細胞抽出液を 4×SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH6.8), 20% glycerol, 4% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), 0.1% Bromophenol Blue)と混合し、95°Cで 10 分間熱処理をした。調製したサンプルを用いて SDS-PAGE を行い、Immobilon-P (Merck Millipore)へ転写した後、メンブレンを常温でブロックエース(DS ファーマバイオメディカル、大阪、日本)処理した。その後、メンブレンを一次抗体と反応させ、引き続き、0.1% Tween20(和光)を含む PBS で洗浄し、二次抗体 (Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG、HRP-conjugated anti-mouse IgG、HRP-conjugated anti-goat IgG (Dako, Glostrup, Denmark))を加え、反応させた。同様に洗浄を行った後、ECL (Thermo Fisher Scientific, Rockland, IL, USA)を用いて処理し、X線フィルム(富士フィルム、東京、日本)に感光した。なお、抗体の希釈には 5% BSA+0.1% Tween20(和光)を含む PBS を用いた。一次抗体には p65, p-p65 (S536), p-ERK (T202/Y204), p-p38 (T180/Y182) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)および ERK1/2, p38α, β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を用いた。

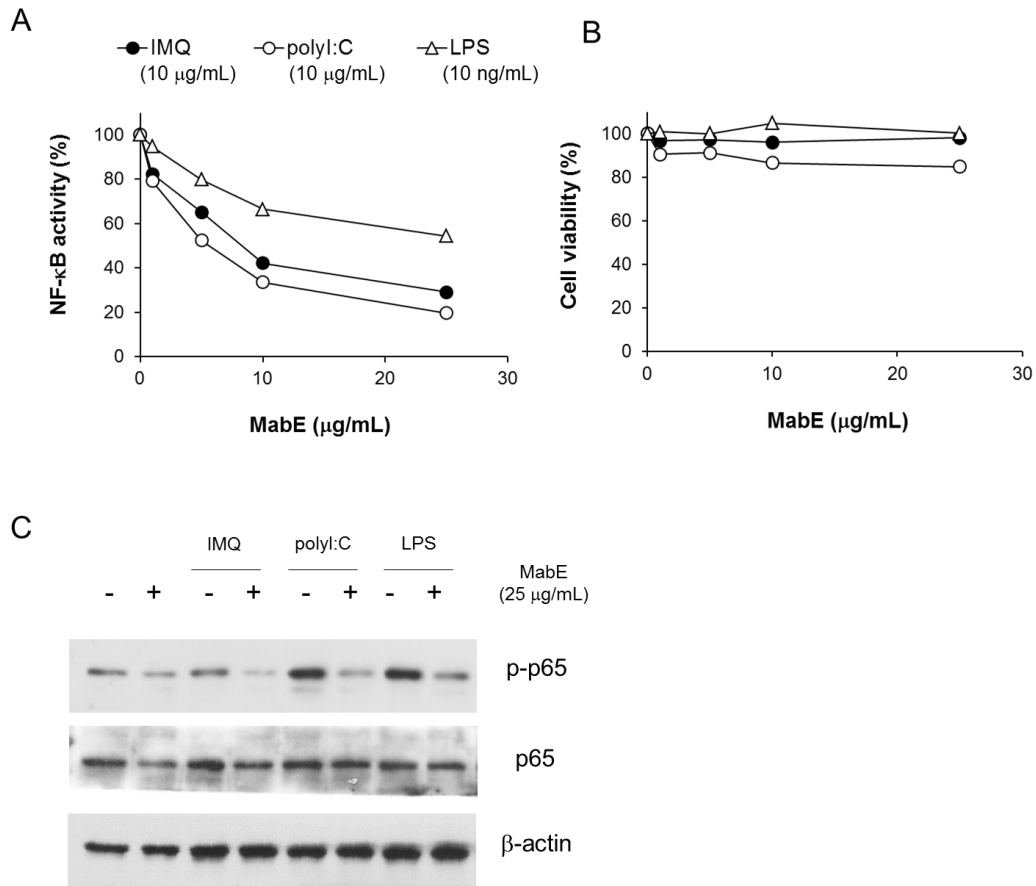
### § 3. 結果と考察

はじめに、TLRリガンドで誘導されるNF- $\kappa$ Bの活性化における至適条件を検討するため、RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2細胞を様々な濃度のTLRリガンドで刺激し、経時的に発光活性を測定した。RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2細胞をIMQ (TLR7)、polyI:C (TLR3)、LPS (TLR4)の各濃度で処置することにより、経時的なNF- $\kappa$ Bの活性化が認められた (Figure 2-2)。次にTLRリガンドで誘導されるNF- $\kappa$ Bの活性化に対するMabEの効果を検討するため、同程度の活性化が観察されたTLRリガンドの濃度でRAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2細胞を処置してMabEの効果を検討した。TLRリガンドで刺激を加える1時間前からMabEを処置することで、IMQ、polyI:C、LPSいずれの刺激に対してもRAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2細胞の発光活性が濃度依存的に抑制された。また、同様の条件においてMabEはRAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2細胞の細胞生存能に影響しなかったことから、MabEによりNF- $\kappa$ B活性化が抑制されることが示された (Figure 2-3A-B)。さらにNF- $\kappa$ Bレポーター活性の抑制に加えて、NF- $\kappa$ B活性化に対するMabEの影響をタンパクレベルで検討するため、RAW264.7細胞におけるp65ならびにリン酸化p65の発現をウェスタンブロット法により検討した。その結果、IMQ、polyI:C、LPSいずれの刺激に対してもRAW264.7細胞でのリン酸化p65の発現増加が認められ、MabE前処置によってその増加は抑制された (Figure 2-3C)。MAPKシグナル伝達経路はNF- $\kappa$ B経路に加えてTLRリガンド刺激における重要なシグナル伝達経路である(39)。そこでTLRリガンドで誘導されるMAPK活性化に対するMabEの効果について、さらに検討した。その結果、IMQ、polyI:C、LPSの刺激に対して誘導されるERK、p38のリン酸化に対してもMabEは抑制効果を示した (Figure 2-4)。以上の結果は、MabEがTLRリガンドで誘導されるRAW264.7細胞におけるNF- $\kappa$ BおよびMAPKシグナル経路の活性化を抑制することを示している。



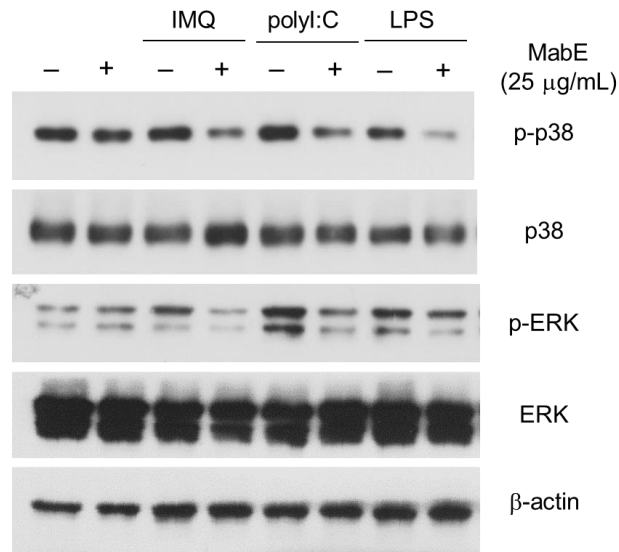
**Figure 2-2. Response of RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 cells to TLR ligands.**

TLR ligands-induced activation of NF $\kappa$ B pathway in RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 cells. Cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were seeded onto 96-well plate and stimulated with each dose of IMQ, polyI:C, LPS for 0-6 hours. Luciferase activity was measured at the indicated time and the relative activity to untreated control cells were determined.



**Figure 2-3. MabE inhibits the TLR ligands-induced activation of NF-κB in RAW264.7 cells.**

(A, B) RAW264.7-NFκB-Luc2 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were seeded onto 96-well plate and pretreated with MabE (1, 5, 10, 25 μg/mL). After 1 hour, they were stimulated by each TLR ligands (IMQ: 10 μg/mL, polyI:C: 10 μg/mL, LPS: 10 ng/mL). Luciferase activity (6 hrs) or cell viability (24 hrs) was measured and the relative activity or viability to untreated control cells were determined. (C) RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were seeded onto 6-well plate and pretreated with MabE (25 μg/mL) or culture medium. After 1 hour, they were stimulated by each TLR ligands (IMQ: 20 μg/mL, polyI:C: 20 μg/mL, LPS: 100 ng/mL) for 3 hours. Equal amounts of protein in cell lysates were analyzed by western blot. The β-actin protein levels were used to confirm that equal amounts of protein were subjected to electrophoresis.



**Figure 2-4. MabE inhibits the TLR ligands-induced activation of MAPK signals in RAW264.7 cells.**

RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were seeded onto 6-well plate and pretreated with MabE (25 µg/mL) or culture medium. After 1 hour, they were stimulated by each TLR ligands (IMQ: 20 µg/mL, polyI:C: 20 µg/mL, LPS: 100 ng/mL) for 3 hours. Equal amounts of protein in cell lysates were analyzed by western blot. The β-actin protein levels were used to confirm that equal amounts of protein were subjected to electrophoresis.



### 第3節

#### § 1. 目的

マクロファージをはじめとする自然免疫細胞における TLR 刺激は、炎症性シグナルの活性化に続き、サイトカインやケモカインの産生を誘導する。これらの炎症性因子は直接的な炎症惹起作用のみでなく、他の免疫細胞に作用し分化、増殖、活性化誘導および炎症局所への免疫細胞の遊走を促進することで炎症の惹起や維持に関与する(44)。慢性炎症には炎症性因子の持続的な産生が重要であることから、その緩和にはこれら炎症性因子の過剰産生を適切に制御する必要がある。前節までに、マクロファージ様 RAW264.7 細胞において TLR リガンドで誘導される NF- $\kappa$ B および MAPK 経路の活性化を MabE が抑制することを示した。本節では TLR リガンド刺激により誘導される RAW264.7 細胞でのサイトカイン遺伝子発現とタンパク産生に対する MabE の効果についてさらに検討した。

#### § 2. 実験方法

##### リアルタイム PCR

RAW264.7 細胞から RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて RNA の回収を行った。各遺伝子発現は ABI Prism 7300 sequence detection system (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用い、リアルタイム PCR により測定した。各遺伝子の発現量は GAPDH の遺伝子発現により補正した。各プライマー配列は以下のとおりである。

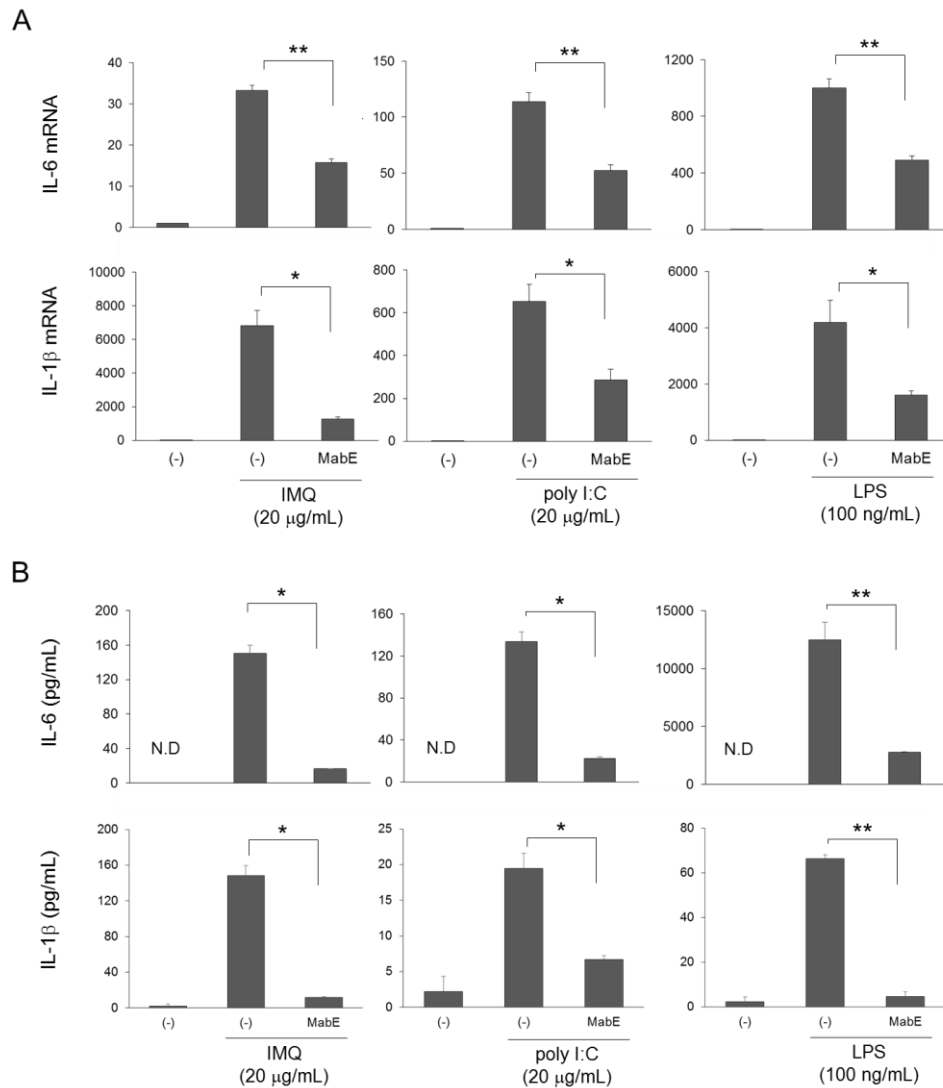
	Forward	Reverse
IL-1 $\beta$	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
IL-6	CTGGAGCCCACCAAGAACGA	GCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG

### 炎症性サイトカインの測定

RAW264.7 細胞を 1%FBS 含有 DMEM 培地を用いて  $1.5 \times 10^5$  cell/well となるよう 24 穴プレートに播種し、37°C で一晩培養した。MabE (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を各 well に加え 1 時間インキュベーションし、その後 IMQ (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), polyI:C (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), LPS (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) それぞれで刺激を加え、37°C で 24 時間培養した後、上清のみを回収しサンプルとした。IL-1 $\beta$  および IL-6 産生量の測定は Mouse IL-1 $\beta$  もしくは IL-6 ELISA MAX<sup>TM</sup> Standard Set (BioLegend®) を用い、マニュアルに沿って行った。

### § 3. 結果と考察

RAW264.7 細胞を各 TLR リガンド (IMQ、polyI:C、LPS) で刺激することによって、IL-1 $\beta$  および IL-6 の遺伝子発現が誘導されるが、MabE の前処置はそのいずれの TLR リガンドによる遺伝子発現の誘導を抑制した。さらに、TLR リガンド刺激から 24 時間で RAW264.7 細胞から培養上清中に産生される IL-1 $\beta$  および IL-6 タンパク産生量も、遺伝子発現と同様に MabE により有意に抑制された (Figure 2-5)。IL-1 $\beta$  は感染等の急性炎症期にマクロファージから産生され、PGE<sub>2</sub> などを介した強力な発熱作用を有する。また IL-6 や TNF- $\alpha$  など他の炎症性サイトカインの産生誘導および作用増強効果を示し、細胞接着分子・ケモカインの産生を介したリンパ球、顆粒球の局所浸潤も促進し急性炎症期の起点となる。一方で、持続的な IL-1 $\beta$  の産生は種々の慢性炎症性疾患の要因となることが報告されている。実際に IL-1 $\beta$  や IL-6 の阻害薬は慢性炎症性疾患に対し臨床でも治療効果を示すことから、MabE についても炎症性疾患に対して有用であることが示唆される。



**Figure 2-5. Effect of MabE on TLR ligand-induced inflammatory cytokine production in RAW264.7 cells.**

(A) RAW264.7 cells were treated with MabE (25  $\mu$ g/mL) for 1 hour, and then stimulated with IMQ (20  $\mu$ g/mL), poly I:C (20  $\mu$ g/mL), and LPS (100 ng/mL) respectively for 3 hours. The mRNA expression levels of interleukin (IL)-6 and IL-1 $\beta$  were quantified by Real-Time PCR. (B) The production of IL-6 and IL-1 $\beta$  were assayed in the culture medium of cells stimulated with IMQ (20  $\mu$ g/mL), poly I:C (20  $\mu$ g/mL), and LPS (100 ng/mL) respectively for 24 hours in the presence of 25  $\mu$ g/mL MabE. After culture supernatants were collected, each cytokines were quantified using ELISA kit according to the manufacturer's instructions. N.D: not detectable. Data are shown as the mean  $\pm$  SD, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with only-stimulated group.

## 第4節

### § 1. 目的

先行研究の結果から、4T1 細胞の恒常的 NF-κB 活性の抑制には MabE 中の Moracin O および Moracin P の二つの Moracin 類化合物が主要な活性成分であることを明らかにしている(27)。前節までに MabE が TLR リガンド刺激により誘導される RAW264.7 細胞での NF-κB 活性化と炎症性サイトカイン産生を抑制することを示した。本節ではマクロファージ様 RAW264.7 細胞における TLR リガンド誘導性の NF-κB 活性化においても、これら 二つの Moracin 類化合物が抑制作用を示すかについて検討を行った。

### § 2. 実験方法

#### 材料

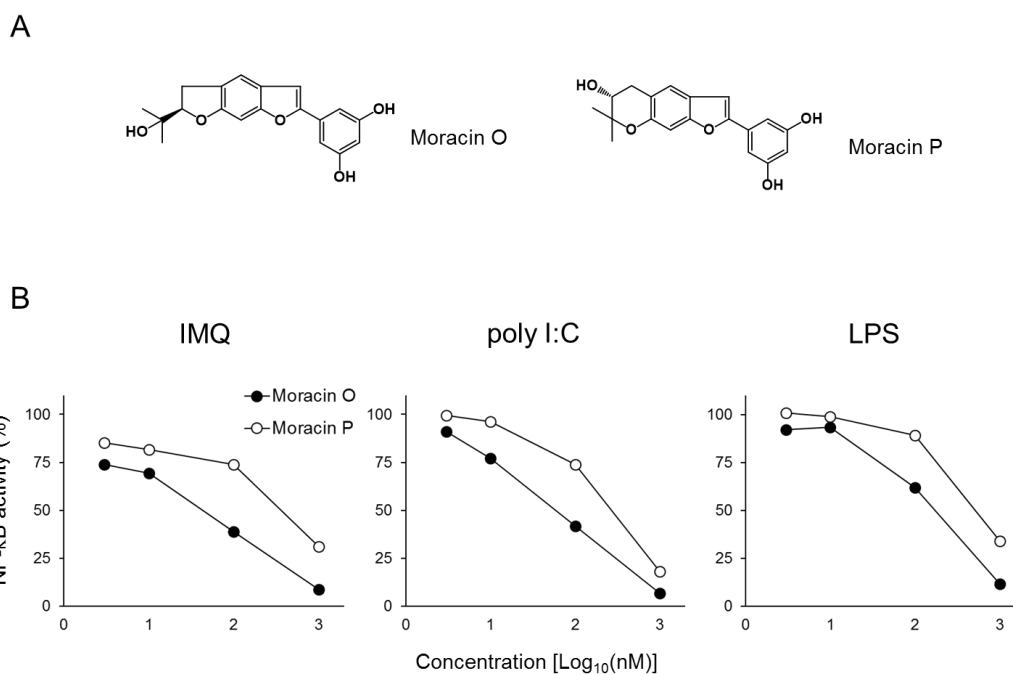
酢酸エチル抽出物をクロロホルムおよびメタノールを溶離液とする逆相中圧液体クロマトグラフィー (RP-MPLC) を用いて分離後、質量分析 (MS) および<sup>1</sup>H-NMR 解析を行うことで Moracin O と Moracin P の二つの化合物を得た。これらの化合物はいずれも DMSO に溶解させ、10 mM の濃度で-20°C で保存したものをを用いた。

#### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

RAW264.7-NFκB-Luc2 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well となるよう 96 穴プレートに播種し 37°C で一晩培養した後、Moracin O, P (0, 0.3, 3, 10, 100, 1000 nM) をそれぞれ加えた。1 時間後、IMQ (10 μg/mL), polyI:C (10 μg/mL), LPS (10 ng/mL) のそれぞれで刺激し、直後にルシフェリン (300 μg/mL) を加え 6 時間後の発光活性を IVIS LUMINA II (Caliper Life Sciences) にて測定した。

### § 3. 結果と考察

Moracin O および Moracin P は、各 TLR リガンド (IMQ、polyI:C、LPS) 刺激で誘導した RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 細胞における発光活性を濃度依存的に抑制した (Figure 2-6)。いずれの TLR リガンド刺激に対しても Moracin O の方が Moracin P と比較して強い抑制効果を示す傾向が見られた。また今回用いた Moracin O および Moracin P の用量では RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 細胞への細胞毒性は見られなかった (data not shown)。以上の結果から、TLR リガンドによる NF- $\kappa$ B 活性化に対する MabE の抑制効果について、Moracin O および Moracin P は重要な活性成分であると考えられる。



**Figure 2-6. Moracin O and Moracin P inhibits the TLR ligands-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 cells.**

(A) Chemical structure of Moracin O and Moracin P. (B) RAW264.7-NF $\kappa$ B-Luc2 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were seeded onto 96-well plate and pretreated with Moracin O or Moracin P (0.3, 3, 10, 100, 1000 nM). After 1 hour, they were stimulated by each TLR ligands (IMQ: 10  $\mu$ g/mL, polyI:C: 10  $\mu$ g/mL, LPS: 10 ng/mL) for 6 hours. Activity of NF- $\kappa$ B was measured by using IVIS imaging system. The inhibitory effect in NF- $\kappa$ B activation was determined as relative NF- $\kappa$ B activation to untreated control.

## 第5節 まとめ

- 1) RAW264.7 細胞でみられる TLR 依存的な NF- $\kappa$ B および MAPK シグナル経路の活性化および炎症性サイトカインの産生が MabE により抑制されることを明らかにした。
- 2) MabE 中に含まれる Moracin O および Moracin P が、抗炎症作用を示す主要な活性化合物であることが示唆された。
- 3) 細胞での局在やシグナル伝達に必要とする補助因子の異なる複数の TLR を起点とした炎症反応が MabE により抑制され、TLR シグナル経路の異常を伴う疾患に対する MabE の有用性が示唆された。

## 第3章

### 第1節 序論

皮膚は体表面を覆い生体と外界とを隔てる物理的バリアを形成すると同時に、様々な免疫反応の誘導に関与しており、人体最大の免疫臓器とみなすこともできる(45, 46)。皮膚バリア機能は熱や圧力等の物理的刺激や紫外線、化学物質等の環境ストレス、さらには病原微生物やアレルゲンの侵入から生体を保護し、生体内の水分や電解質、たんぱく質などの漏出を防ぐことで生体の恒常性維持にも深くかかわっている(47)。皮膚の構造は表皮・真皮・皮下組織の3つに大きく分類され、表皮はさらに角層・顆粒層・有棘層・基底層から構成される。真皮には抗原提示細胞や自然リンパ球、各種T細胞等様々な免疫細胞が存在する(46, 48)。

代表的な炎症性皮膚疾患のひとつである乾癬は、表皮のターンオーバー亢進による紅斑や皮膚の浸潤・肥厚、過剰な角質細胞が鱗状の白色片を形成した鱗屑およびその脱落(落屑)が典型症状として認められ、T細胞性自己免疫疾患のひとつに分類される(49)。発症頻度には人種差が知られており、欧米では人口の約3%であるのに対し、日本では0.1~0.4%程度と比較的少ないことから認知度の低い疾患であった。しかし食生活の欧米化やライフスタイルの変化から、近年患者数の増加が問題となっている。ウイルス感染や外傷などの環境要因、飲酒・喫煙といった生活習慣の他に、ビタミンD欠乏などの遺伝的要因が発症に寄与していると考えられ、関節炎や糖尿病、心血管系疾患の合併リスクが高いことが報告されている(50, 51)。重症度や患者の希望に合わせ治療方針の決定が為されるが(Figure 3-1)、安全性や病変部への限定的作用の期待からステロイドやビタミンD<sub>2</sub>の外用薬が第一選択となり、また、近年では生物学的製剤の使用も増加している(49)。



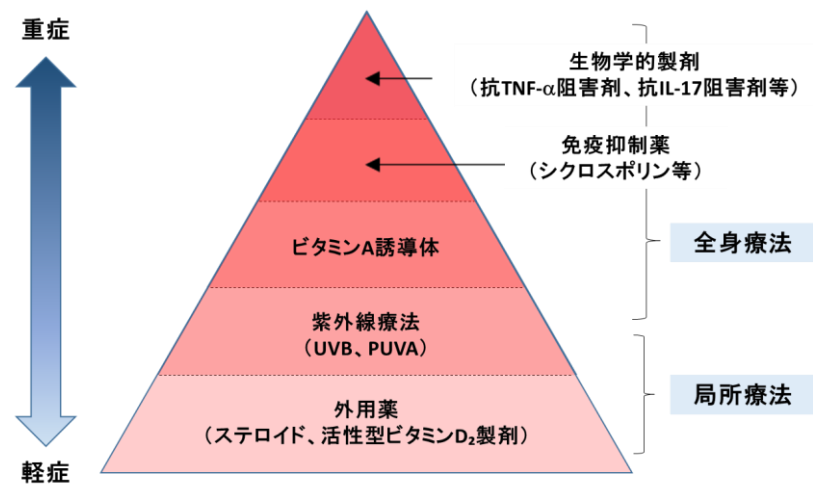


Figure 3-1. 乾癬の治療ピラミッド

乾癬は角質の肥厚やケラチノサイトの分化異常といった病理組織学的な特徴から、1970年代まで免疫疾患とは考えられていなかった(52)。しかし、後に免疫抑制薬の投与が乾癬の皮疹に効果を発揮することから、乾癬と免疫反応との関係が注目され始め、1995年に Jim Krueger らによって IL-2 とジフテリア毒素の融合製剤が乾癬に対し有効であると報告されたことで、乾癬が T 細胞性免疫関連疾患であることが明らかとなった。乾癬に関わる T 細胞性免疫応答は多岐にわたるが、病変部では IFN- $\gamma$ が高発現する一方で、IL-4 や IL-13 など Th2 サイトカインの発現はほとんど認められず、当初は Th1 型の免疫疾患であると考えられていた(53, 54)。しかし、研究が進むにつれ乾癬病態における炎症性サイトカイン IL-17A の重要性が明らかとなり、IL-17A 産生細胞と併せてその役割が注目されてきた(55-57)。主な IL-17A 産生細胞として Th17 細胞や $\gamma\delta$ T17 細胞が知られており、その維持・増殖には IL-23 が重要であることも知られている(57, 58)。実際、臨床において IL-23 の p19 サブユニットに対する抗体であるグセルクマブや IL-17A 阻害薬であるセクキヌマブ、ブロダルマ

ブが乾癬に対し優れた効果を発揮することから(59-61)、現在では IL-23/IL-17A 経路が乾癬病態の治療ターゲットとして重要であることが広く認知されている(62-64)。

以上の様に、乾癬の原因や発症に関わる免疫学的な機序が明らかとなってきたが、一方でその治療において生物学的製剤は高価で使用に際して種々の制限があることから、課題も多い。また、乾癬やアトピー性皮膚炎をはじめとする難治性皮膚疾患はいまだアンメットメディカルニーズの高い炎症性疾患であり治療満足度も低いことから、新規治療薬の開発が求められている。これらの背景から、本章では難治性皮膚疾患に対する和漢薬の桑白皮および発酵玄米食品の薬効・薬理作用について検討した。

## 第2節

### § 1. 目的

乾癬は症状の違いにより尋常性乾癬、乾癬性関節炎、滴状乾癬、乾癬性紅皮症、膿疱性乾癬に分類されるが、患者の80%以上が尋常性乾癬である(以下、乾癬は尋常性乾癬のことを指す)。尋常性乾癬の病態モデルとして前章で用いたTLR7リガンドであるIMQ誘発皮膚炎モデルが知られている。このモデルにおける炎症性皮膚症状は紅斑や角化亢進、皮膚の浸潤・肥厚、鱗屑および免疫細胞の浸潤など乾癬患者と類似する特徴を示すことが知られている。また本モデルはIL-23/IL-17A経路がその発症に重要である点も、ヒト乾癬病態との類似点である(65, 66)。また一般的にIMQ誘発皮膚炎モデルではC57BL/6系統マウスが用いられるが、Balb/c系統の方がIL-17依存的な免疫反応が起こりやすいとの報告もある(67, 68)。そこで本節ではIMQ誘発皮膚炎モデルを用いて和漢薬の薬効を評価するにあたり、炎症病態におけるIL-17の重要性とマウス系統差について検討を行った。

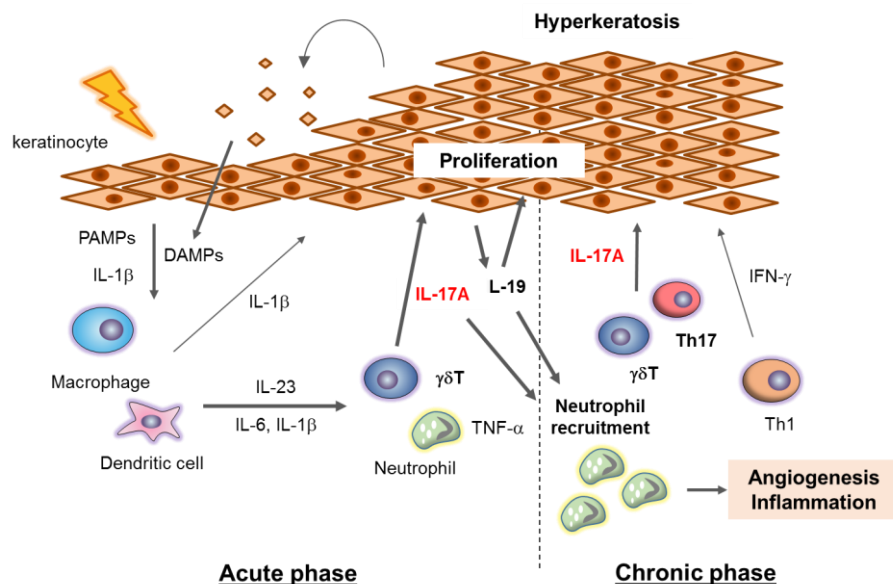


Figure 3-2. 乾癬発症のメカニズム

## § 2. 実験方法

### マウス

Balb/c および C57BL/6J マウスは日本エスエルシー株式会社(浜松、日本)から購入した。C57BL/6J 背景の IL-17A 欠損マウスおよび IFN- $\gamma$ 欠損マウスは東京理科大学(千葉、日本)からご供与いただき、東京大学医科学研究所実験動物研究施設にて維持された。すべて富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野の動物飼育室にて飼育し、水および固形飼料は自由摂取とした。本実験は、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に基づき、動物実験委員会の承認後、動物倫理に十分配慮し行った。

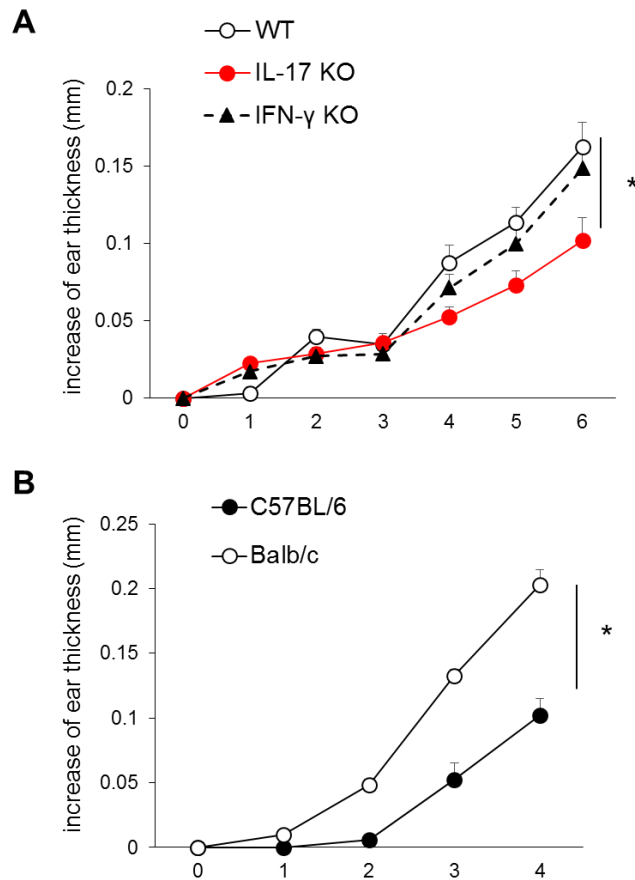
### Imiquimod (IMQ) 誘発乾癬モデルマウスの作製

マウスの耳介に 5% IMQ 含有クリーム(ベセルナクリーム、持田製薬)を片耳当たり 20 mg (IMQ として 1 mg)となるよう塗布し、24 時間後の耳介の肥厚を計測器で測定した。4 日または 6 日間連続で処置することにより、乾癬様症状を誘発させた。

## § 3. 結果と考察

IMQ 誘発乾癬モデルは、既報に従って 5% IMQ 含有クリーム (IMQ として 1 mg) をマウス耳介に連日塗布することで作製した。Figure3-3A に示す様に、野生型 C57BL/6J マウス (WT) では IMQ 塗布によって経日的に耳介の肥厚が認められ、塗布開始後 5 日目頃から鱗屑・落屑も観察された。さらに IL-17A 欠損マウスでは WT マウスで認められる耳介の肥厚が著しく減弱したが、一方 IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは WT と同程度であった (Figure3-3A)。また、Balb/c マウスでは C57BL/6J マウスと比較して IMQ 塗布による耳介肥厚が有意に亢進した

(Figure 3-3B)。以上の結果は、IMQ 誘発乾癬モデルにおける IL-17A の重要性を支持するものであり、さらに Balb/c マウスでは C57BL/6J マウスに比べて IMQ で誘導される IL-17A 依存的な耳介の肥厚がより顕著に生じることが明らかになった。この結果をふまえ、以降の和漢薬の IMQ 誘発乾癬モデルにおける薬効評価系には、より顕著な病態を示した Balb/c マウスを用いることとした。



**Figure 3-3. Increase of ear thickness by IMQ topical application.**

Mice were received a daily topical dose of Imiquimod cream (5%, 20 mg) on the right ear for four to six consecutive days. Ear thickness was measured on the days indicated. (A) Comparison of wild type (C57BL/6) and IL-17 knockout or IFN- $\gamma$  knockout mice. (B) Comparison of C57BL/6 and Balb/c mice. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$ . The presented data are representative of three independent experiments.

## 第3節

### § 1. 目的

炎症性疾患に対する MabE の効果を明らかにするため、IMQ 誘発乾癬モデルにおける耳介肥厚に対する抑制効果について検討した。また、IMQ 誘発乾癬モデルでの病態形成に関わる炎症性サイトカインや炎症性マーカーの耳介組織での遺伝子発現、ならびに耳介組織への免疫細胞の浸潤を免疫組織化学染色によって検討を行い、これらに対する MabE の効果をさらに検討した。

### § 2. 実験方法

#### 桑白皮抽出エキス

第 2 章参照。

使用直前に 50%エタノールで 10 mg/mL の濃度に希釈し、実験に使用した。

#### Imiquimod 誘発耳介浮腫

Balb/c マウスを用い、第 3 章第 2 節記載の手順に沿って IMQ 誘発乾癬を誘導した。IMQ 塗布 30 分前に、MabE 群は MabE 溶液を片耳当たり 200 µg、コントロール群および IMQ 群には 20% DMSO 溶液を等量処置した。耳介の肥厚は計測器を用い 24 時間毎に測定し、同様の操作を 6 日間繰り返し行った。6 日目にマウスを犠牲死させ解析に使用した。

#### リアルタイム PCR

マウス耳介からの RNA は TRIZOL (Invitrogen)により抽出した。各遺伝子発現は ABI Prism 7300 sequence detection system (Life Technologies Corporation, Garlsbad, CA, USA)を用い、リアルタイム PCR により測定した。

各遺伝子の発現量は GAPDH の遺伝子発現により補正した。各プライマー配列は以下のとおりである。

	Forward	Reverse
IL-17A	CACCTCACACGAGGCACAAG	GCAGCAACAGCATCAGAGACA
IL-1 $\beta$	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
IL-19	TGACGTTGATTCTCTGCTCAGTTC	AGGGACAGGATGGTGACATTTTTT
COX-2	GTGTGCGACATACTCAAGCAGGA	TGAAGTGGTAACCGCTCAGGTG
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG

#### 免疫蛍光染色法による組織学的解析

IMQ 塗布 6 日目のマウス耳介を回収し、4%パラホルムアルデヒドで組織固定を行った後、30%スクロースに置換し 3 日間浸漬した。組織を PBS で洗浄後、Optimal cutting temperature (OCT) コンパウンド (Sakura Finetek Japan) に包埋し、液体窒素中で凍結、-80°C で保存した。CM3050S cryostat (Leica Microsystems) を用いて厚さ 10-20  $\mu\text{m}$  の凍結切片スライドを作製した。切片スライドを十分に風乾させた後、PBS で洗浄後 5% BSA 含有 PBST で室温にて 1 時間ブロッキングを行い FITC 標識抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体 (GL3, BioLegend, 1:500) または FITC 標識抗 CD4 抗体 (GK1.5, TONBO, 1:500) を 4°C で 24 時間反応させた (遮光)。PBST で洗浄後、Mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) で対比染色および封入を行った。組織標本の染色画像は共焦点レーザー顕微鏡 (ツアイス LSM700) を用いて撮影した。

### § 3. 結果と考察

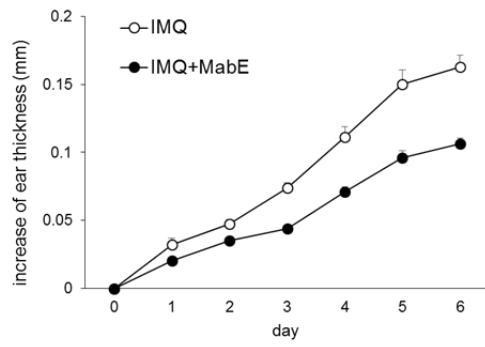
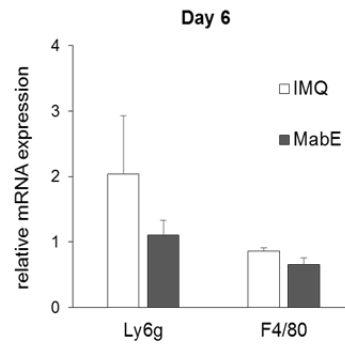
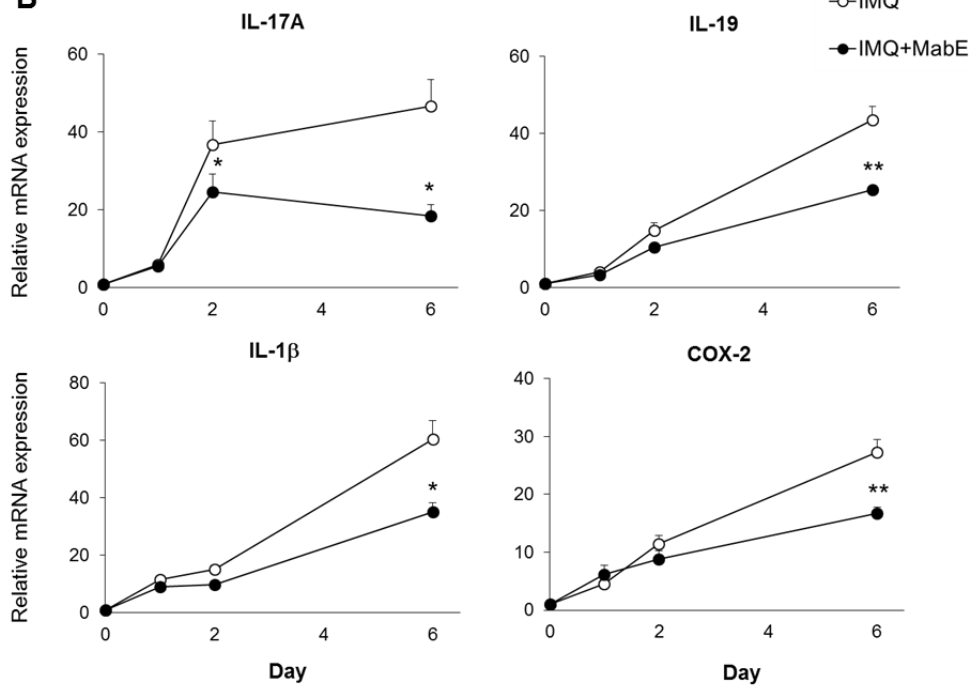
IMQ 塗布による耳介肥厚に対する MabE の効果は、各日の IMQ 塗布 30 分前に MabE (200  $\mu\text{g}$ ) を局所投与 (塗布) することで評価した。対照群と比較して



MabE 投与群では IMQ 塗布により認められる経日的な耳介の肥厚増加の抑制が見られ、IMQ 塗布開始から 6 日後では有意な差であった (Figure 3-4A)。次に、本モデルの発症に重要である IL-17A の耳介組織における遺伝子発現について検討した。IMQ 塗布開始からそれぞれ 0, 1, 2, 6 日目に耳介から RNA を回収し、リアルタイム PCR 法による解析を行った。その結果、IMQ 塗布により耳介組織での IL-17A 遺伝子発現が経日的に増加し、MabE 処置群ではその増加が有意に抑制された (Figure 3-4B)。さらに、IL-17A に加えて乾癬病態形成に関連することが知られている IL-1 $\beta$ 、IL-19 および Cox-2 の耳介組織での遺伝子発現について検討した結果、IMQ 塗布によりそれぞれの遺伝子発現の経日的な増加が見られ、MabE 処置はこれを抑制した (Figure 3-4B)。また、IL-17A や IL-19 は好中球遊走促進作用も有することから(69)、IMQ 塗布開始後 6 日目における耳介組織での好中球マーカー Ly6g、ならびにマクロファージマーカー F4/80 の遺伝子発現について検討したところ、MabE 処置群では Ly6g 遺伝子発現の抑制傾向が見られた (Figure 3-4C)。以上の結果から、MabE が IMQ 誘発乾癬モデルでの耳介肥厚に対して抑制効果を示すこと、その効果が耳介局所での IL-17A や病態発症に関わる炎症マーカーの発現抑制と相関することが明らかとなった。

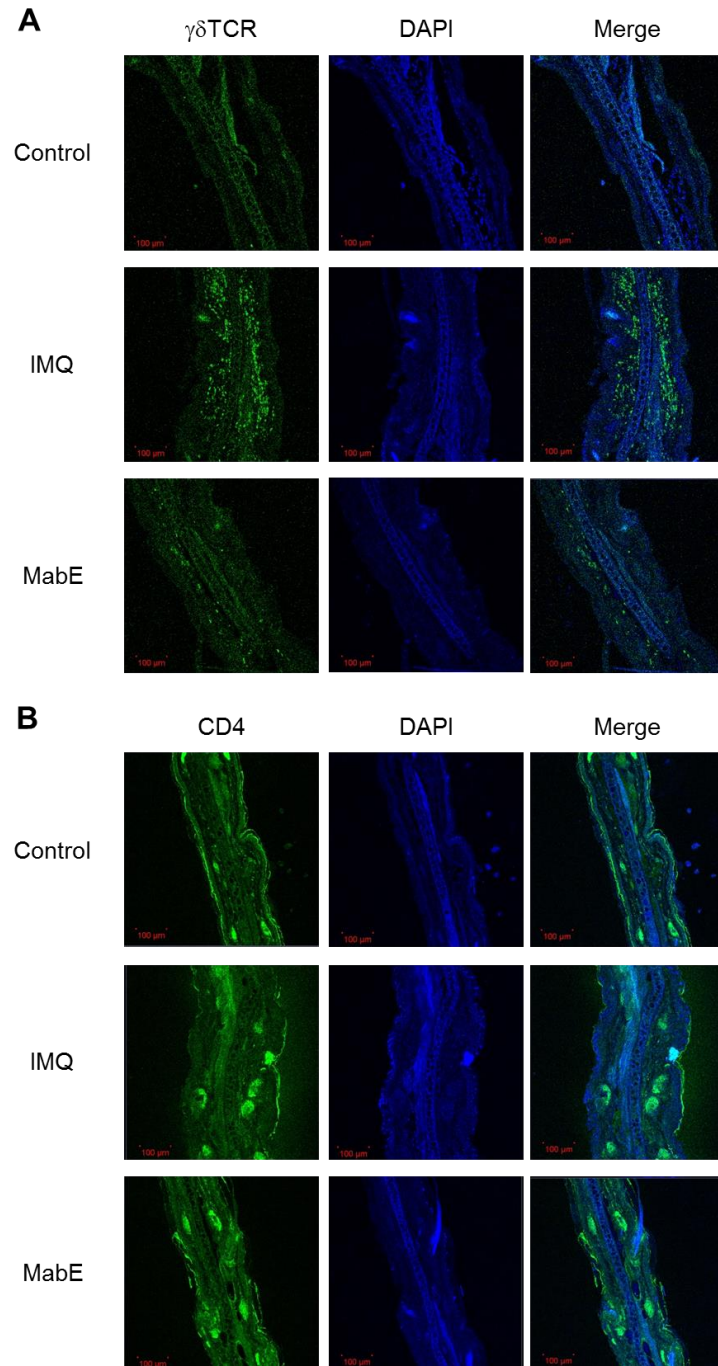
MabE が IMQ 誘発乾癬モデルの炎症局所における IL-17A 遺伝子発現を抑制したことから、次に IL-17A 産生細胞に対する MabE の作用を検討した。IL-17A 産生細胞には $\gamma\delta$ T 細胞( $\gamma\delta$ T17 細胞)、CD4<sup>+</sup>T 細胞 (Th17 細胞)、CD8<sup>+</sup>T 細胞 (Tc17 細胞)、NKT 細胞など様々なタイプの免疫細胞があることが知られているが、IMQ 誘発乾癬モデルではヒト乾癬病態と同様に $\gamma\delta$ T17 細胞と Th17 細胞が重要であると報告されている(70)。そこで、IMQ 誘発乾癬モデルにおいてこれら $\gamma\delta$ T 細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞の耳介組織での局在と MabE 処置に伴うその変化

について、免疫組織化学染色により解析した。IMQ を 6 日間塗布したマウスの耳介組織では未処置マウスと比較して、表皮の肥厚と真皮での $\gamma\delta$ T 細胞の顕著な増加が認められた。さらにこの IMQ 塗布による耳介組織での $\gamma\delta$ T 細胞の増加は MabE 処置により抑制された (Figure 3-5A)。一方、CD4<sup>+</sup>T 細胞については未処置マウスと比較して IMQ 塗布による耳介組織での増加はほとんど観察されず、また MabE 処置群と IMQ 群で差異も認められなかった (Figure 3-5B)。これらの結果から、IMQ 誘発乾癬モデルでの耳介肥厚に対する MabE の抑制作用は、炎症局所での IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の増加抑制を介したメカニズムであることが示唆される。

**A****C****B**

**Figure 3-4. MabE attenuates IMQ-induced skin inflammation.**

Balb/c mice were received a daily topical dose of Imiquimod cream (5%, 20 mg) on their ears for six consecutive days. A group of mice were treated with MabE (200  $\mu$ g in 20  $\mu$ L) on their ears 30 minutes before IMQ challenge. (A) Ear thickness was measured on the days indicated. (B, C) Mice were sacrificed and the skin biopsies were collected. Relative mRNA expression of the indicated genes are shown. The data indicate normalized mRNA expression in each time points compared to untreated control mice (day 0, n=4-6 mice/ group). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01. The presented data are representative of three independent experiments.



**Figure3-5. MabE inhibits  $\gamma\delta$ T cell invasion to inflammatory site.**

Balb/c mice were treated with IMQ cream for 6 consecutive days, and collected the auricular tissue. Immunofluorescence of  $\gamma\delta$ TCR (green) (A), CD4 (green) (B) with nuclear staining (DAPI, blue). Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

## 第4節

### § 1. 目的

IMQ 誘発乾癬モデルでは全身性に $\gamma\delta$ T17 細胞の活性化が報告されている。そこで次に本節では、IMQ 耳介塗布後の脾臓における $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17A 産生に対する MabE の効果を検討することで、皮膚を起点とした全身性免疫反応に対する MabE の作用を明らかにすることを目的とした。

### § 2. 実験方法

#### フローサイトメリー解析

IMQ 処置、MabE 処置マウスおよびコントロールマウスから脾臓を回収し、RPMI1640 培地中で組織片をすりつぶし溶血処理を行った。その後 80  $\mu$ m フィルターで濾過し、PBS で洗浄、遠沈することで細胞懸濁液を調製した。フローサイトメリーによる解析を目的とし、Fc $\gamma$ レセプターへの非特異的結合を回避するため細胞懸濁液を抗 CD16/32 (2.4G2)抗体と反応させた後、蛍光標識抗体を用いて染色を行った。抗体には FITC 標識抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体 (GL3、BioLegend)、PE 標識抗 CD27 抗体 (LG.3A10、BioLegend)、PE 標識抗 IL-17A 抗体 (TC11-18H10.1、BioLegend)、APC 標識抗 NKp46 抗体 (29A1.4、BioLegend)、PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体 (RM4-5、BD Bioscience) および PE-Cy7 標識抗 CD3 $\epsilon$ 抗体 (145-2C11、BioLegend) を使用し、FACSCantII (BD Bioscience) にてフローサイトメリー解析を行った。データ解析は Flowjo ソフトウェア (Tree Star) にて行った。

#### IL-17A 測定

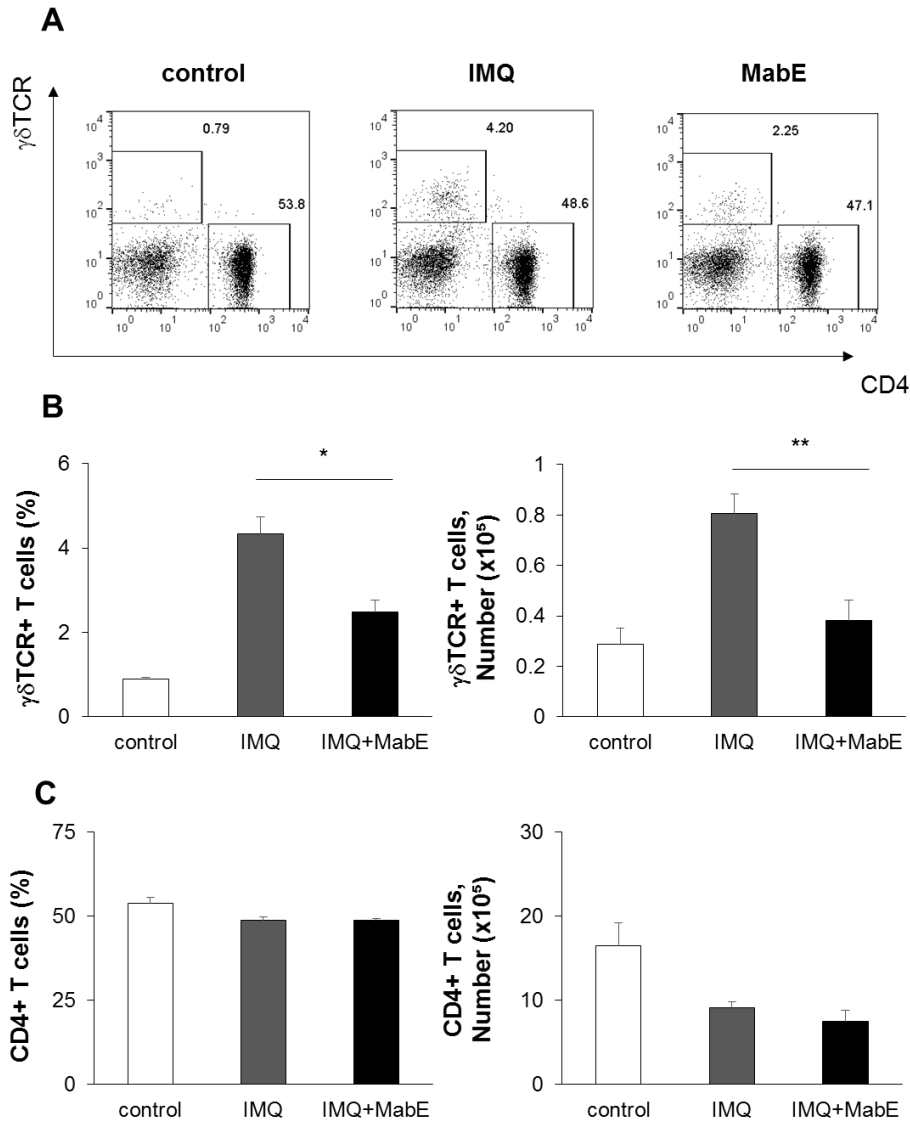
IMQ 処置、MabE 処置マウスから脾臓を回収し、RPMI1640 培地中で組織片をすりつぶし溶血処理を行った。その後 80  $\mu$ m フィルターで濾過し、脾臓細胞を調製した。調製した脾臓細胞を  $2 \times 10^6$  cells/well となるよう 24 穴プレートに播種し、PMA (10 ng/mL) / Ionomycin A (500 ng/mL)を含む RPMI1640 培地中で 24 時間培養した後、培養上清を回収した。同様の手順でコントロールマウスから回収したナイーブな脾臓細胞は、MabE (50, 100  $\mu$ g/mL)を添加した RPMI1640 培地中で 1 時間反応させた後、PMA (10 ng/mL) / Ionomycin (500 ng/mL)で刺激し、24 時間後に上清を回収した。回収した上清は使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、IL-17A 産生量の測定は Mouse IL-17A ELISA MAX™ Standard Set (BioLegend®)を用い、マニュアルに沿って行った。

### § 3. 結果と考察

IMQ の耳介経皮投与後の全身性免疫応答に対する MabE の効果を検討するため、IMQ 処置 (6 日間) 群、または未処置コントロール群のマウスの脾臓からリンパ球を回収しフローサイトメトリー解析を行った。その結果、IMQ 処置群の脾臓では未処置コントロール群と比較し  $\gamma\delta$ T 細胞の顕著な増加が認められた (Fig3-6A, B)。一方で CD4<sup>+</sup>T 細胞は IMQ 塗布群とコントロール群の間で有意な変化は認められなかった (Fig3-6A, C)。この結果は耳介局所での免疫組織化学染色の結果と一致しており、また本実験モデルでの  $\gamma\delta$ T 細胞の重要性を示した既報とも一致する結果である。さらに、IMQ 塗布による脾臓での  $\gamma\delta$ T 細胞の増加は、MabE 耳介投与により T 細胞中の割合、絶対数の指標いずれにおいても有意に抑制された (Figure 3-6 A, B)。IL-17A 産生  $\gamma\delta$ T 細胞は IFN- $\gamma$ 産生型  $\gamma\delta$ T 細胞と比較して細胞表面マーカーである CD27 分子の発現が低い性質を持つことが広く知られている。そこで次に、IMQ 耳介塗布マウスにおける脾臓リンパ球中の IL-17A 産生

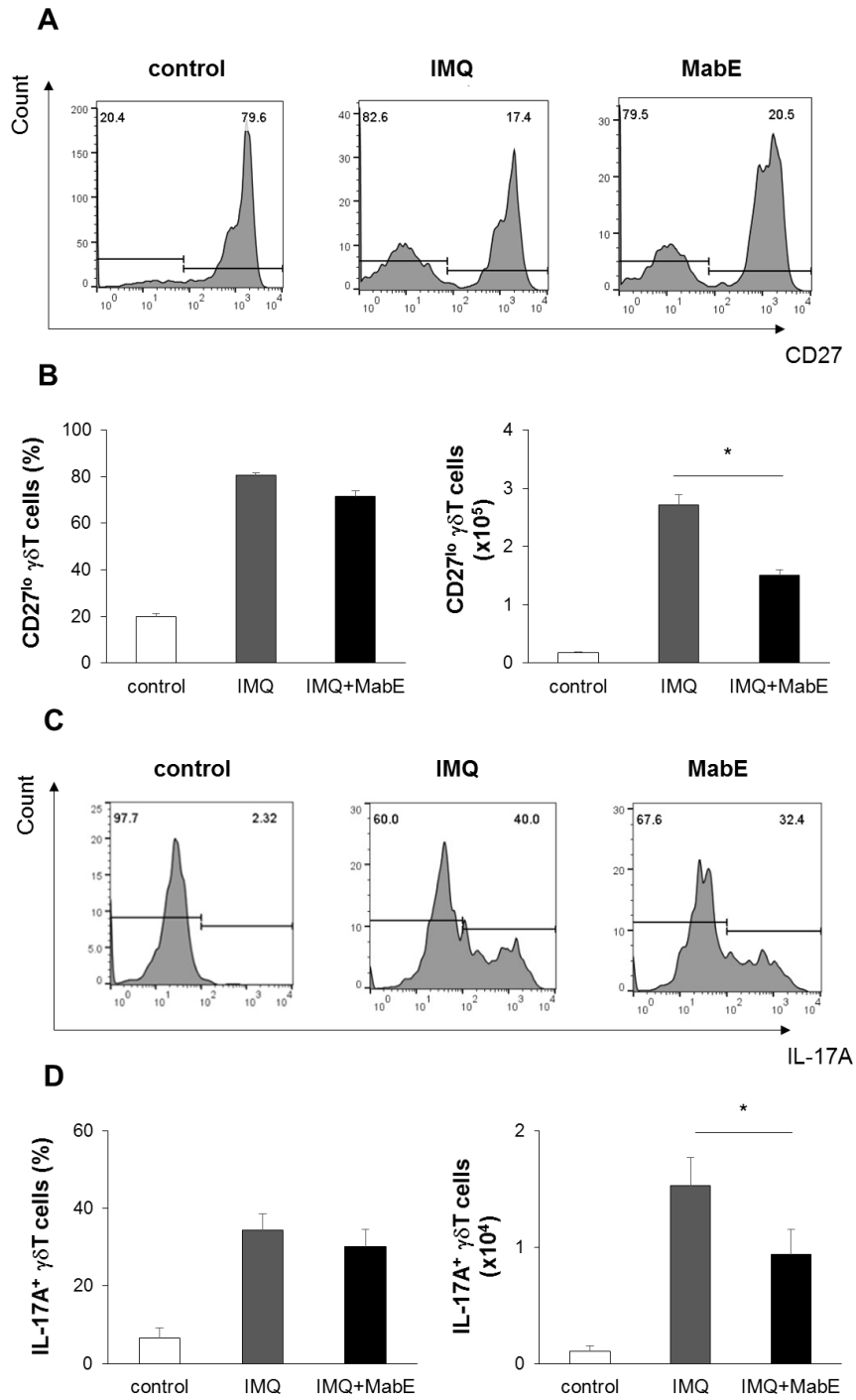
$\gamma\delta$ T 細胞サブセットである CD27<sup>lo</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17A 産生に対する MabE の影響について検討した。その結果、脾臓での CD27<sup>lo</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞 C (Fig. 3-7A, B) および細胞内サイトカイン染色により評価した IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞 (Fig. 3-7C,D) の割合と細胞数は IMQ 塗布により顕著に増加した。耳介への MabE 処置は脾臓での CD27<sup>lo</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞ならびに IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 細胞の IMQ 処置による割合の増加には影響を及ぼさなかった一方で、細胞数の増加は有意に抑制した (Figure 3-7)。さらにこれらの脾細胞を PMA/Ionomycin A で刺激した際に産生される IL-17A の産生量を定量した。その結果、耳介での IMQ 刺激により脾細胞から産生される IL-17A は増加し、MabE 処置はそれを有意に抑制した (Figure 3-8A)。加えて未処置マウス脾細胞を PMA/Ionomycin A で刺激した際に誘導される IL-17A 産生に対しても、*in vitro* で MabE と共培養することで脾細胞からの IL-17A 産生を濃度依存的に抑制した (Figure 3-8B)。これらの結果は、IMQ 塗布により炎症局所と同様脾臓でも免疫細胞の活性化が誘導され、MabE の耳介局所投与によりそれら全身性免疫応答が抑制されることを示しており、その作用は  $\gamma\delta$ T 細胞全体数の減少に基づく IL-17A 産生の抑制によると考えられる。乾癬患者では症状が進行するにつれ全身性免疫の異常を伴う他臓器障害がしばしば見受けられ、MabE の局所投与が全身性免疫の活性化に対し抑制効果を示したことは、皮膚症状のみでなく乾癬患者でみられるその他の症状に対しても抑制的に働く可能性がある。また、*in vitro* で MabE が PMA/Ionomycin A で刺激した際の脾細胞からの IL-17A 産生に対しても抑制効果を示したことから、TLR 活性化のみならず、 $\gamma\delta$ T17 細胞を起点とする炎症反応に対しても有用であることを示唆する結果と考える。





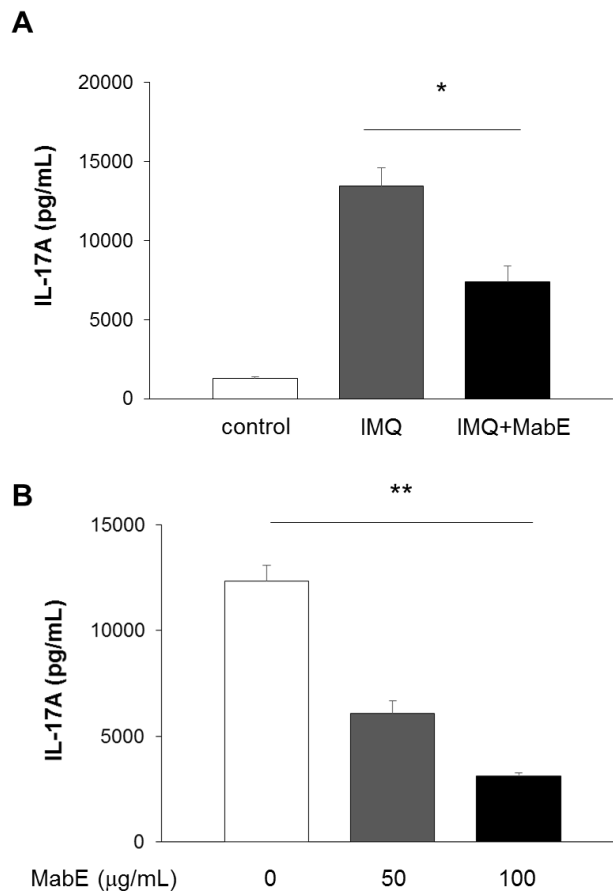
**Figure 3-6. MabE decreases IMQ-induced activation of  $\gamma\delta$ T cells.**

Balb/c mice were treated with IMQ cream for 6 consecutive days, and splenocytes were collected. (A) Cells were subjected to flow cytometry analysis and the representative dot plots of lymphocytes electronically gated on CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> cells are shown. The numbers are the percentage of cells electronically gated on  $\gamma\delta$ T cells ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) and CD4<sup>+</sup>T cells ( $\gamma\delta$ TCR<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>). (B, C) Summary (n=4 mice/ group) of percentages and cell numbers of  $\gamma\delta$ T cells (B) and CD4<sup>+</sup>T cells (C) are shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01. The presented data are representative of three independent experiments.



**Figure 3-7. MabE does not affect IL-17A-inducing  $\gamma\delta$ T cell population.**

Balb/c mice were treated with IMQ cream for 6 consecutive days, and splenocytes were collected. (A, C) Cells were subjected to flow cytometry analysis and the representative histogram of CD27 (A) or IL-17A (C) in lymphocytes electronically gated on  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (in CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>) cells are shown. (B, D) Summary (n=4 mice/ group) of percentages and cell numbers of CD27<sup>lo</sup>  $\gamma\delta$ T cells (B) and IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T cells (D) are shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05. The presented data are representative of at least two independent experiments.



**Figure 3-8. IL-17A production from MabE-treated mice are less compared with IMQ-treated mice.**

(A) Splenocytes collected from IMQ-treated mice on day 6 were ( $2 \times 10^6$  cells/well) stimulated with PMA (10 ng/mL) and Ionomycin A (500 ng/mL) for 24 hours. The cell-free culture supernatants were collected and the production of IL-17A were determined by ELISA. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared with IMQ-treated mice. (B) Naïve Balb/c splenocytes were incubated with or without MabE (50 or 100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 hour, then stimulated with PMA (10 ng/mL) and ionomycin A (500 ng/mL) for 24 hours. The cell-free culture supernatants were collected and the concentration of were measured by ELISA. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ . The presented data are representative of three independent experiments.

## 第5節

### § 1. 目的

FBRA (Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae*) は玄米とその米ぬかを麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で発酵させて調製した機能性食品成分であり、和漢薬として用いられる粳米とも関連する。FBRA は麹菌による発酵過程で炭水化物やタンパク質が代謝され、様々な薬理作用を示す物質を含有することが知られている。これまでに FBRA が肝炎や大腸炎マウスモデル、または炎症が発がんに関連するがんモデルに対し予防効果を示すといった報告が多くある一方で、その抗炎症作用については明らかでない(71-77)。そこで、本節では IMQ 誘発乾癬モデルを用いて FBRA の抗炎症作用について明らかとすることを目的とした。

### § 2. 実験方法

#### 材料

マウスには、通常食 (MF、オリエンタルイースト株式会社、東京、日本)、または玄米とその米ぬかを麹菌で発酵させて調製した加工食品を重量当たり 10% 含有する MF (10% FBRA 含有食) を自由摂取させた。FBRA は玄米酵素株式会社 (札幌、日本) から供与いただき、組成は Table 1 に示す通りである。

#### Imiquimod 誘発耳介浮腫

第 3 章第 2 節を参照。FBRA 摂取群には初回 IMQ 塗布の 10 日前から 10% FBRA 含有食を自由摂取させ、IMQ 塗布を行っている 4 日間も摂取を続けた。コントロール群は通常食を自由摂取させた。

### リアルタイム PCR

第 3 章第 3 節参照。各遺伝子の発現量は $\beta$ -actin の遺伝子発現により補正した。各プライマー配列は以下のとおりである。

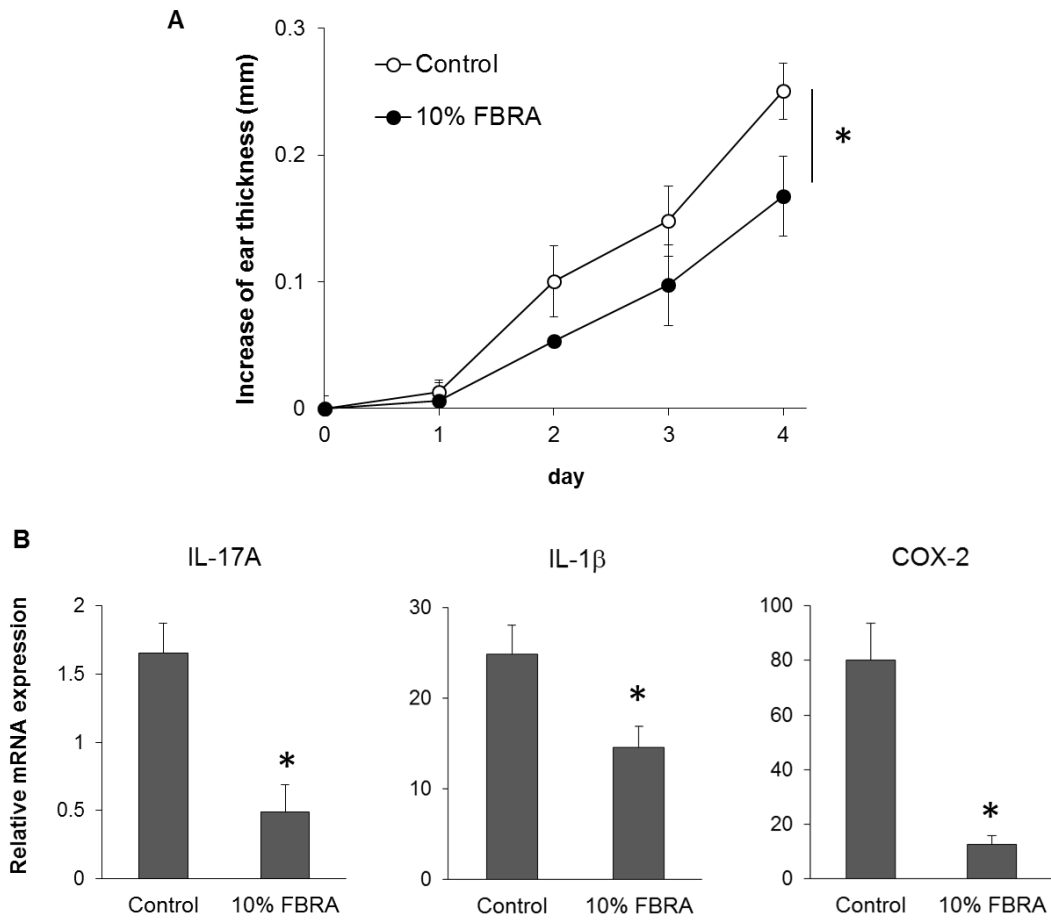
	Forward	Reverse
IL-17A	CACCTCACACGAGGCACAAG	GCAGCAACAGCATCAGAGACA
IL-1 $\beta$	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
COX-2	GTGTGCGACATACTCAAGCAGGA	TGAAGTGGTAACCGCTCAGGTG
$\beta$ -actin	GCACAGAGCCTCGCCTT	GTTGTCGACGACGAGCG

### § 3. 結果と考察

IMQ 誘発乾癬モデルに対する FBRA の効果を検討するため、マウスに通常食(コントロール群)または 10% FBRA 含有食(10% FBRA 群)いずれかの条件で 10 日間飼育後、IMQ を塗布した際に見られる耳介肥厚を測定した。その結果、10% FBRA 群ではコントロール群と比較して IMQ 塗布により誘導される耳介肥厚が有意に抑制された(4 日間塗布後、Figure 3-9A)。さらに、IMQ 4 日間塗布後の耳介皮膚組織から RNA を回収し、IL-17A、IL-1 $\beta$ 、および COX-2 の各遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した結果、IMQ 塗布によってコントロール群で見られるこれら遺伝子発現の増加が、10% FBRA 群で有意に抑制された(Figure 3-9B)。これらの結果から、FBRA は IMQ により誘導される皮膚炎症に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。

**Table 1. Composition of FBRA**

Ingredient	Amount / 100 g
Energy	348 kcal
Protein	15.2 g
Fat	19.7 g
Carbohydrate	27.5 g
Fiber	22.7 g
Ash	10.0 g
Calcium	346 mg
Sodium	6.7 mg
Zinc	6.63 mg
Copper	700 µg
Phytic acid	5.15 g
Thiamin	2.73 mg
Riboflavin	0.75 mg
Vitamin B6	3.41 mg
Tocopherol	12.0 mg
SOD	1.1 x 10 <sup>3</sup> unit
Amylase	3.6 x 10 <sup>3</sup> unit
Lactic acid bacteria	5.7 log CFU/g
Yeast	4.5 log CFU/g



**Figure 3-9. Effect of FBRA-containing diet on IMQ-induced psoriasis model.**

Balb/c mice were received a daily topical dose of Imiquimod cream (5%, 20 mg) on the right ear for four consecutive days. Mice were fed with control diet or 10% FBRA diet for 10 days before the first IMQ challenge. (A) Ear thickness was measured by thickness gauge 24 hrs after the each IMQ challenge. (B)

On day 4, mice were sacrificed and the skin biopsies were collected. Expression level of IL-17A, IL-1β, and COX-2 mRNAs in skin samples were determined by real-time PCR. Data are shown as relative mRNA expression normalized to β-actin mRNA. Data are shown as the mean ± SD, \*p<0.05 compared with control samples.



## 第6節 まとめ

- 1) MabE の耳介経皮投与により、IMQ で誘発される乾癬様皮膚症状が抑制され、その抑制作用は $\gamma\delta$ T 細胞全体数の減少に基づく IL-17A の産生抑制を介したメカニズムであることが示唆された。
- 2) IMQ の耳介塗布により誘導される全身性免疫の活性化が MabE の耳介経皮投与により抑制されることを明らかとした。
- 3) FBRA 含有食餌の摂取により、IMQ 誘発乾癬様症状および炎症局所での炎症関連因子の遺伝子発現が抑制されることを明らかとした。

## 第4章 総括と展望

桑白皮、ならびにその活性化化合物 Moracin O および Moracin P はがん細胞における恒常的な NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し、ヒトケラチノサイト細胞株における TRAIL 誘導性の細胞損傷に対し細胞保護効果を示した(27)。一方、正常な生体反応では何らかの外来刺激を起点として NF- $\kappa$ B を含めた炎症性シグナルの活性化が誘導され生体防御応答が引き起こされるが、このような生体防御応答における炎症反応に対する桑白皮の効果はまだ知られていない。本研究ではまず TLR を起点とした炎症反応に焦点を当て、桑白皮および活性化化合物の抗炎症作用について検討を行った。3つの異なる TLR リガンド、それぞれ polyI:C、LPS、IMQ によって誘導される炎症性シグナル経路の活性化および炎症性サイトカインの産生が、桑白皮抽出エキスである MabE によって抑制された。polyI:C、LPS、IMQ はそれぞれ TLR3、TLR4 および TLR7 により認識されるが、これらの受容体は細胞での局在や認識する刺激が異なり、TLR4 は主に細胞膜上に発現し細菌由来のリポ多糖やリポテイコ酸を認識するのに対し、TLR3 と TLR7 はエンドソーム膜上に発現しそれぞれウイルス由来の dsRNA および ssRNA を認識する。また、TLR がシグナル伝達に必要な主要な補助因子として MyD88、TIRAP (Mal)、TRIF (TICAM-1)、TRAM (TICAM-2) が知られている。TLR3 は TRIF、TLR4 は MyD88/TIRAP および TRAM/TRIF、TLR7 は MyD88 を必要とする(37, 40)。MabE が異なる TLR を介し誘導される炎症性シグナルの活性化に対し抑制効果を示したことから、MabE の抗炎症作用は TLR の局在や必要とする補助因子に依存しないことが示唆された。TLR シグナルの異常を伴う疾患は数多く報告されているが、その多くは単一の受容体に起因した疾患ではなく、複数の刺激や TLR が病態形成に関わっていることが知られている。MabE

の抗炎症作用が特定の TLR に限定されたものではなくより広範に作用を示したことから、これら疾患に対しても有用となる可能性がある。

さらに MabE が IMQ で誘発される乾癬様皮膚症状を抑制することを明らかにした。乾癬病態は IL-17A 依存性の炎症であると考えられており、本実験系においても IMQ の局所塗布によって誘発された耳介浮腫は IL-17A 欠損マウスで有意に軽減される。また、MabE の経皮投与は、炎症局所および脾臓における  $\gamma\delta$ T 細胞数と IL-17A 産生を抑制した。 $\alpha\beta$ T 細胞が末梢リンパ組織で外来抗原と接触することにより機能分化するのに対し、 $\gamma\delta$ T 細胞は胎生期の胸腺分化段階で既に IL-17A 産生型と IFN- $\gamma$ 産生型に分化しており、IL-17A 産生型は CD27 の発現が低く、その維持に IL-23 を必要であることが知られている (Figure 4-2) (78-81)。MabE は  $\gamma\delta$ T 細胞中の CD27<sup>lo</sup> および IL-17A<sup>+</sup>細胞の存在割合には影響しなかったため、MabE の作用は  $\gamma\delta$ T 細胞の機能分化制御とは別の機序によると推察している。

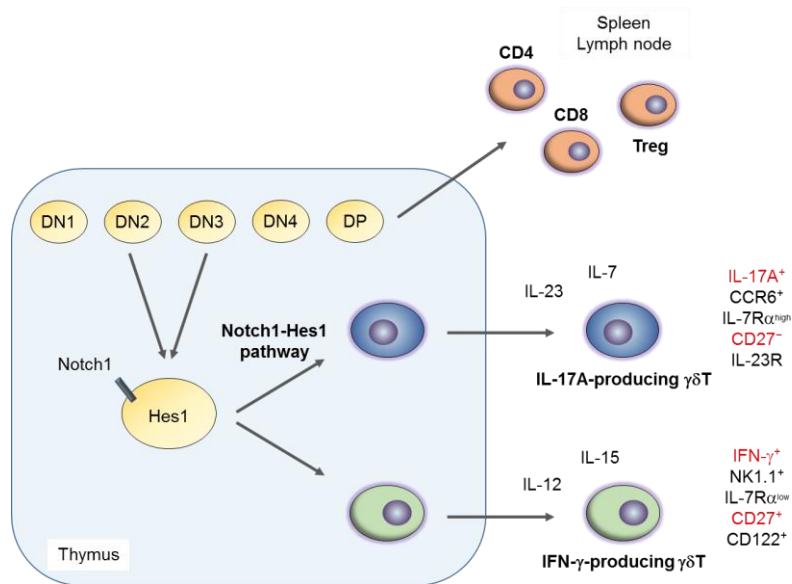


Figure 4-2.  $\gamma\delta$ T 細胞の機能分化

IL-17A は直接的な炎症惹起作用の他に、様々な炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導することで、間接的に乾癬の病態形成に関与していると考えられている(82)。なかでも IL-19 は IL-17A によりケラチノサイトから産生が誘導され、ケラチノサイト自身の過剰増殖と表皮の肥厚を促進し、また乾癬病変部での発現が高いエフェクターサイトカインのひとつであり、その機能が注目されている(83-85)。IMQ 投与皮膚では IL-17A の遺伝子発現の増加に続き IL-19 の発現上昇が観察され、MabE によって有意に抑制された。この結果は MabE が炎症反応を抑制するのみでなく、表皮の角化亢進に対しても阻害効果を示すことを意味すると考察している。また、IL-17A を介した CXCL1 や CXCL8 の産生は炎症局所への好中球遊走を促進し、炎症部における血管形成の促進や持続的な炎症反応に寄与することが知られている(69, 86)。近年、IL-17A 自身に加えて、IL-17A により誘導される好中球が様々な炎症性疾患に関与していることが明らかとなっており、IL-17A や IL-17A 産生細胞がこれら炎症性疾患の治療標的として注目されている(64, 87-90)。例えば、気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液には IL-17A が多く存在し、喘息の重症度と正の相関関係も報告されている(91)。また、一部のアトピー性皮膚炎患者では IL-17A の発現と病変部への好中球の浸潤の相関が報告されている(55, 92)。一般的に、このような好中球性の炎症反応はステロイドによる治療効果が乏しいことから、新規治療薬の開発が期待されている(93-95)。この点において、MabE は IL-17A 産生を抑制する作用機序を持つことから (Figure 4-3)、これら疾患に対する新たな治療薬候補となり得ることが期待できる。

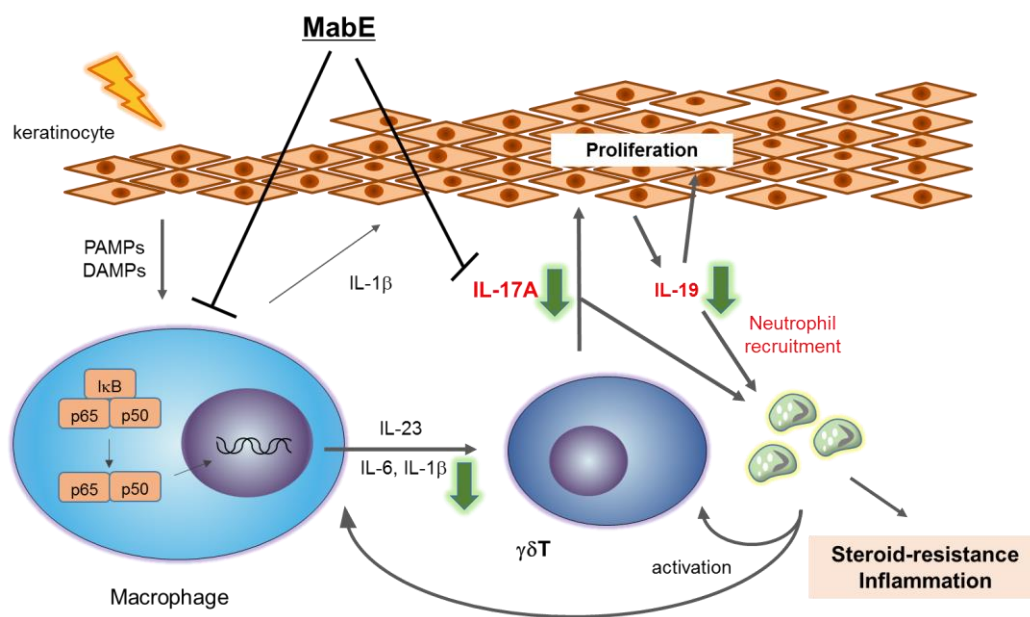


Figure 4-3. MabE の作用機序

MabE の抗炎症作用における生物活性化合物として、これまでに Moracin O および Moracin P の二つを同定しているが、MabE 中に含まれるこれら二つの化合物は極微量であり、本研究で MabE が有効性を示す濃度と Moracin O、Moracin P の薬理作用を比較すると、MabE でより高い抗炎症作用が認められる。このことは MabE 中に含まれる他成分の重要性を意味すると考察しており、MabE の強い抗炎症作用は単一化合物によるものではないことが示唆され、すなわち MabE はエキス製剤として有用であると考察できる。桑白皮に加え、10% FBRA 含有食の事前摂取でも IMQ 誘発乾癬様皮膚炎が抑制されたことから、和漢薬である粳米にも同様の炎症性皮膚疾患に対する作用が期待できる。MabE についても、FBRA と同様に IMQ 塗布以前から予防的に経皮投与することで、IMQ 塗布後の局所における炎症メディエーターの遺伝子発現が著しく減少するという結果を得ており (data not shown)、MabE についても疾病発症予防的に応用することも可能であると推測できる。一般的に慢性炎症に関連した疾患の多くは病状が表在化するまで発見されず、一方で疾患

発症へとつながる慢性炎症に対処するための積極的な予防・先制医療の実現は為されていない。桑白皮や粳米は伝統医薬として医食にも用いることが可能であり、健康食品や機能性食品として日常的に摂取が可能である。桑白皮エキスについては、経皮投与で有効性を示すことや、既に報告しているケラチノサイトに対する保護作用等をふまえると(27)、スキンケア等の方法で日常生活への応用できる可能性が考えられる。これらの生薬もしくは生薬由来成分を予防的に活用し、将来的には病態形成以前の慢性炎症を抑制して疾患の発症を制御する、新たな予防・先制医療の実現に期待したい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました富山大学和漢医薬学総合研究所 生体防御学領域 早川芳弘教授に心より御礼申し上げます。また、多岐にわたり適切なお助言をいただきました富山大学薬学部 がん細胞生物学研究室 横山悟准教授に深く感謝の意を表します。

また、富山大学和漢医薬学総合研究所 天然物創薬学領域 Suresh Awale 准教授には研究材料を供与して頂きました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり協力していただいた Besse Hardianti さん、笠原栞さん、菅原美沙さんをはじめ、富山大学和漢医薬学総合研究所 生体防御学領域の学生の皆様に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
2. Rock KL, Lai J-J, Kono H. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunol Rev*. 2011;243(1):191-205.
3. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):149-64.
4. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*. 2009;8(1):18-30.
5. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017;542(7640):177-85.
6. Lai KSP, Liu CS, Rau A, Lanctôt KL, Köhler CA, Pakosh M, et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2017;88(10):876.
7. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(27):9577.
8. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2001;2(8):675-80.
9. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*. 2013;14(10):1014-22.
10. Gerada C, Ryan KM. Autophagy, the innate immune response and cancer. *Mol Oncol*. 2020;14(9):1913-29.
11. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2018;18(11):63.
12. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2005;17(4):338-44.
13. Frevert CW, Felgenhauer J, Wygrecka M, Nastase MV, Schaefer L. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *J Histochem Cytochem*. 2018;66(4):213-27.
14. Devarapu SK, Anders H-J. Toll-like receptors in lupus nephritis. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):35-.
15. Cui J, Chen Y, Wang HY, Wang R-F. Mechanisms and pathways of innate immune



activation and regulation in health and cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014;10(11):3270-85.

16. Medvedev AE. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33(9):467-84.
17. Sun L, Liu W, Zhang L-J. The Role of Toll-Like Receptors in Skin Host Defense, Psoriasis, and Atopic Dermatitis. *J Immunol Res*. 2019;2019:1824624-.
18. Sen R. The origins of NF- $\kappa$ B. *Nature Immunology*. 2011;12(8):686-8.
19. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res*. 2011;21(1):146-58.
20. Tokunaga F, Sakata S-i, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- $\kappa$ B activation. *Nature Cell Biology*. 2009;11(2):123-32.
21. Solt LA, Madge LA, May MJ. NEMO-binding domains of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  regulate I $\kappa$ B kinase complex assembly and classical NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem*. 2009;284(40):27596-608.
22. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*. 2005;446(5):475-82.
23. Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
24. Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor- $\kappa$ B pathway to induce metastatic potential. *Cancer Sci*. 2013;104(5):558-62.
25. Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):351-69.
26. Takahashi K, Nagai N, Ogura K, Tsuneyama K, Saiki I, Irimura T, et al. Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated inflammation. *Cancer Sci*. 2015;106(7):867-74.
27. Hardianti B, Umeyama L, Li F, Yokoyama S, Hayakawa Y. Anti-inflammatory compounds moracin O and P from *Morus alba* Linn. (Sohakuhi) target the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol Med Rep*. 2020;22(6):5385-91.
28. Lee HJ, Ryu J, Park SH, Woo E-R, Kim AR, Lee SK, et al. Effects of *Morus alba* L. and Natural Products Including Morusin on In Vivo Secretion and In Vitro Production of Airway MUC5AC Mucin. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2014;77(2):65-72.
29. Jung HW, Kang SY, Kang JS, Kim AR, Woo E-R, Park Y-K. Effect of Kuwanon G Isolated from the Root Bark of *Morus alba* on Ovalbumin-induced Allergic Response in a

- Mouse Model of Asthma. *Phytotherapy Research*. 2014;28(11):1713-9.
30. Paudel P, Seong SH, Wagle A, Min BS, Jung HA, Choi JS. Antioxidant and anti-browning property of 2-arylbenzofuran derivatives from *Morus alba* Linn root bark. *Food Chemistry*. 2020;309:125739.
  31. Yang Z-G, Matsuzaki K, Takamatsu S, Kitanaka S. Inhibitory effects of constituents from *Morus alba* var. *multicaulis* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Molecules*. 2011;16(7):6010-22.
  32. Cho D-H, Lim S-T. Germinated brown rice and its bio-functional compounds. *Food Chemistry*. 2016;196:259-71.
  33. Wattanathorn J, Ohnon W, Thukhammee W, Muchmapura S, Wannanon P, Tong-Un T. Cerebroprotective Effect against Cerebral Ischemia of the Combined Extract of *Oryza sativa* and *Anethum graveolens* in Metabolic Syndrome Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9658267-.
  34. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
  35. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(1):92.
  36. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2019;129(7):2619-28.
  37. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11(5):373-84.
  38. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;388(4):621-5.
  39. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004;16(1):3-9.
  40. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020;180(6):1044-66.
  41. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nature Medicine*. 2007;13(5):543-51.
  42. Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(6):344-57.
  43. Nwet Win N, Hardianti B, Kasahara S, Ngwe H, Hayakawa Y, Morita H. Anti-

- inflammatory activities of isopimarane-8(14),-15-diene diterpenoids and mode of action of kaempulchraols P and Q from *Kaempferia pulchra* rhizomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(2):126841.
44. Ramani T, Auletta CS, Weinstock D, Mounho-Zamora B, Ryan PC, Salcedo TW, et al. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. *International Journal of Toxicology*. 2015;34(4):355-65.
  45. Chambers ES, Vukmanovic-Stejić M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*. 2020;160(2):116-25.
  46. Matejuk A. Skin Immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(1):45-54.
  47. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*. 2004;17(s1):43-8.
  48. Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, Colegio OR. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Arch*. 2017;469(3-4):455-63.
  49. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*. 2020;323(19):1945-60.
  50. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees AS, Leonardi CL, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(5):826-50.
  51. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;41(3):401-7.
  52. Voorhees JJ. Pathophysiology of Psoriasis. *Annual Review of Medicine*. 1977;28(1):467-73.
  53. Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(1):317-27.
  54. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The Majority of Epidermal T Cells in Psoriasis Vulgaris Lesions can Produce Type 1 Cytokines, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 Effector Populations:1 a Type 1 Differentiation Bias is also Measured in Circulating Blood T Cells in Psoriatic Patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(5):752-9.
  55. Guttman-Yassky E, Krueger JG. Atopic dermatitis and psoriasis: two different

- immune diseases or one spectrum? *Current Opinion in Immunology*. 2017;48:68-73.
56. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*. 2007;13(2):139-45.
57. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nature Immunology*. 2017;18(6):612-21.
58. Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, et al. IL-23 from Langerhans Cells Is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17A-Producing  $\gamma\delta$  T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(7):1912-21.
59. Nogueira M, Torres T. Guselkumab for the treatment of psoriasis - evidence to date. *Drugs Context*. 2019;8:212594-.
60. Krueger JG, Wharton KA, Schlitt T, Suprun M, Torene RI, Jiang X, et al. IL-17A inhibition by secukinumab induces early clinical, histopathologic, and molecular resolution of psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019;144(3):750-63.
61. Bissonnette R, Luger T, Thaçi D, Toth D, Lacombe A, Xia S, et al. Secukinumab demonstrates high sustained efficacy and a favourable safety profile in patients with moderate-to-severe psoriasis through 5 years of treatment (SCULPTURE Extension Study). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(9):1507-14.
62. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2018;201(6):1605.
63. Jeon C, Sekhon S, Yan D, Afifi L, Nakamura M, Bhutani T. Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017;13(10):2247-59.
64. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(10):763-76.
65. van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*. 2009;182(9):5836.
66. Moos S, Mohebiany AN, Waisman A, Kurschus FC. Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice Depends on the IL-17 Signaling of Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2019;139(5):1110-7.
67. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. INNATE IMMUNE RESPONSE IN TH1- AND TH2-DOMINANT MOUSE STRAINS. *Shock*. 2004;22(5).
68. Mosley Y-YC, Lu F, HogenEsch H. Differences in innate IFN $\gamma$  and IL-17 responses to *Bordetella pertussis* between BALB/c and C57BL/6 mice: role of  $\gamma\delta$ T cells, NK cells, and dendritic cells. *Immunologic Research*. 2017;65(6):1139-49.

69. Sumida H, Yanagida K, Kita Y, Abe J, Matsushima K, Nakamura M, et al. Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2014;192(9):4361.
70. Hartwig T, Pantelyushin S, Croxford AL, Kulig P, Becher B. Dermal IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells establish long-lived memory in the skin. *European Journal of Immunology*. 2015;45(11):3022-33.
71. Katayama M, Sugie S, Yoshimi N, Yamada Y, Sakata K, Qiao Z, et al. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on diethylnitrosoamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Oncol Rep*. 2003;10(4):875-80.
72. Katayama M, Yoshimi N, Yamada Y, Sakata K, Kuno T, Yoshida K, et al. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran against colon carcinogenesis in male F344 rats. *Oncol Rep*. 2002;9(4):817-22.
73. Kuno T, Hirose Y, Hata K, Kato K, Qiang SH, Kitaori N, et al. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. *Int J Oncol*. 2004;25(6):1809-15.
74. Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, et al. Preventive Effects of Fermented Brown Rice and Rice Bran against Prostate Carcinogenesis in TRAP Rats. *Nutrients*. 2016;8(7):421.
75. Phutthaphadoong S, Yamada Y, Hirata A, Tomita H, Taguchi A, Hara A, et al. Chemopreventive effects of fermented brown rice and rice bran against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Oncol Rep*. 2009;21(2):321-7.
76. Onuma K, Kanda Y, Suzuki Ikeda S, Sakaki R, Nonomura T, Kobayashi M, et al. Fermented Brown Rice and Rice Bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) Prevents Inflammation-Related Carcinogenesis in Mice, through Inhibition of Inflammatory Cell Infiltration. *Nutrients*. 2015;7(12):10237-50.
77. Shibata T, Nagayasu H, Kitajo H, Arisue M, Yamashita T, Hatakeyama D, et al. Inhibitory effects of fermented brown rice and rice bran on the development of acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats. *Oncol Rep*. 2006;15(4):869-74.
78. Shibata K, Yamada H, Sato T, Dejima T, Nakamura M, Ikawa T, et al. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Blood*. 2011;118(3):586-93.
79. Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, Ohkawa Y, Yamada H, et al. A Genome-Wide Analysis Identifies a Notch-RBP-J $\kappa$ -IL-7R $\alpha$  Axis That Controls IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cell Homeostasis in Mice. *The Journal of Immunology*. 2015;194(1):243-51.

80. Akitsu A, Iwakura Y. Interleukin-17-producing  $\gamma\delta$  T ( $\gamma\delta$ 17) cells in inflammatory diseases. *Immunology*. 2018;155(4):418-26.
81. Wang Y, Li X, Xing X, Xue H, Qi R, Ji H, et al. Notch-Hes1 Signaling Regulates IL-17A(+)  $\gamma\delta$  (+)T Cell Expression and IL-17A Secretion of Mouse Psoriasis-Like Skin Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:8297134-.
82. Hartupee J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T. IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization. *The Journal of Immunology*. 2007;179(6):4135-41.
83. Witte E, Kokolakis G, Witte K, Philipp S, Doecke W-D, Babel N, et al. IL-19 Is a Component of the Pathogenetic IL-23/IL-17 Cascade in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(11):2757-67.
84. Oka T, Sugaya M, Takahashi N, Nakajima R, Otobe S, Kabasawa M, et al. Increased Interleukin-19 Expression in Cutaneous T-cell Lymphoma and Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(10):1172-7.
85. Konrad RJ, Higgs RE, Rodgers GH, Ming W, Qian Y-W, Bivi N, et al. Assessment and Clinical Relevance of Serum IL-19 Levels in Psoriasis and Atopic Dermatitis Using a Sensitive and Specific Novel Immunoassay. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5211.
86. Chiang C-C, Cheng W-J, Korinek M, Lin C-Y, Hwang T-L. Neutrophils in Psoriasis. *Front Immunol*. 2019;10:2376-.
87. Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017;614:8-14.
88. Kurschus FC, Moos S. IL-17 for therapy. *Journal of Dermatological Science*. 2017;87(3):221-7.
89. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J-i, Kaneko K, Watanabe K, et al. Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013:968549.
90. Ruiz de Morales JMG, Puig L, Daudén E, Cañete JD, Pablos JL, Martín AO, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmunity Reviews*. 2020;19(1):102429.
91. Gurczynski SJ, Moore BB. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2018;314(1):L6-L16.
92. Sugaya M. The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(4):1314.
93. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, et al. T<sub>H</sub>17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway

Hyperresponsiveness in Mice. *The Journal of Immunology*. 2008;181(6):4089-97.

94. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets*. 2011;12(4):556-62.

95. Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, et al. Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:609395.