

氏名 うめやま りん
梅山 凜

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 370 号

学位授与年月日 令和 3 年 4 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 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
(Application of traditional medicines in the control of
biological barrier function and inflammatory diseases)

論文審査委員

(主査) 教授 久米 利明
(副査) 教授 櫻井 宏明
(副査) 教授 早川 芳弘 (指導教員)

論文題目：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

課程・専攻名：医学薬学教育部（博士後期課程）・薬科学専攻

氏 名：梅山 凜

炎症反応は生体防御を担う免疫応答のひとつであり、病原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生じ、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。通常、原因物質の除去および組織修復に伴い速やかに収束するが、一方で何らかの原因で炎症が慢性化することで生体に有害作用を示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、自己免疫疾患など様々な疾患の発症や重症化における慢性炎症の重要性が明らかとなってきた。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となる。

免疫反応は自然免疫系と獲得免疫系の二つに大別される。長い間これら二つは完全に区別され、高度な特異性を有する獲得免疫系が免疫反応の主体と考えられてきた。しかし Toll 様受容体（TLR）の発見を契機に、獲得免疫の誘導に自然免疫系の活性化が必須であることが明らかとなり、現在では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。また、多くの炎症性疾患で自然免疫系の異常と病態形成との関連性が報告されており、免疫反応の起点とも言える自然免疫系の制御は、様々な炎症・免疫関連疾患の発症や重症化の抑制に繋がると考えられる。

慢性炎症の関与する疾患は主に対症療法が治療の主体であり、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いる。和漢薬の使用により、それ自身の治療効果に加え、ステロイド等既存治療の減量も期待できることから、炎症性疾患の治療に対する適切な和漢薬の利用が望まれるが、薬理作用や治療効果における科学的エビデンスの不足から臨床適応が困難となる場合も多い。それ故、和漢薬の薬理作用や作用機序を明らかとすることは、炎症性疾患を対象とした治療への応用を目的とする上で非常に重要となる。先行研究の成果から桑白皮 (*Morus alba* Linne. bark) が NF- κ B 活性化を抑制し、ケラチノサイトに対する細胞保護作用を示すことが明らかとなっており、また粳米 (*Oryza sativa* Linne) についても抗炎症作用を有するという報告がなされていることから、桑白皮および粳米または玄米に関連する食品成分が炎症性疾患に対し有用であることが期待される。

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) の効果を明らかとし、さらに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薬理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。

1. 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¹

マクロファージは自然免疫を担う代表的な免疫細胞の一つであり、様々な TLR を発現する。TLR を介した自然免疫の誘導やそれに続く獲得免疫の活性化は、生体防御機構としての役割を果たす一方、種々の炎症性疾患の要因となることが知られており、TLR 活性化シグナルを適切に制御することが重要となる。TLR を介した炎症性シグナルの活性化に対する MabE の効果を明らかにするため、本研究では発現場所や関与する補助因子の異なる TLR として TLR3,4,7 に着目し、それぞれのリガンドとして polyI:C, LPS, Imiquimod (IMQ) を用いた。まず初めに各種 TLR リガンドで誘導される NF- κ B 活性化に対する MabE の効果を明らかにするため、マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞または NF- κ B 応答性ルシフェラーゼ遺伝子安定発現株 RAW264.7-NF κ B-Luc2 細胞を用いレポーターアッセイおよび p65 のリン酸化レベルについて検討を行った。その結果、各刺激で誘導される NF- κ B レポーター活性および p65 のリン酸化が、MabE の前処置により抑制された。さらに、MAPK 経路の活性化に対しても、刺激で誘導される ERK および p38 のリン酸化が MabE により抑制された。次に、NF- κ B や MAPK 経路の活性化により誘導される炎症性サイトカイン産生が、慢性炎症の惹起、維持に重要であることから、IL-1 β および IL-6 に対する MabE の効果を検討した結果、遺伝子発現とタンパク産生いずれもが MabE により抑制されることが示された。さらに、MabE 中に含まれる Moracin O および Moracin P の二つの化合物によって TLR リガンドにより誘導される NF- κ B レポーター活性の上昇が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、TLR を介し活性化される自然免疫反応が MabE および Moracin O、Moracin P により抑制されることが明らかとなり、その抑制効果は特定の TLR に依存しないことが示唆された。

2. 炎症性皮膚疾患モデルに対する和漢薬の有用性^{1,2}

乾癬やアトピー性皮膚炎に代表される難治性皮膚疾患は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たな治療薬の開発が求められている。そこで乾癬患者と同様に IL-17A 依存的な乾癬様皮膚症状を呈することが知られている IMQ 誘発マウス乾癬モデルを用い、桑白皮および発酵玄米食品 (FBRA) の薬効・薬理作用を検討することで、難治性皮膚疾患に対する和漢薬の有用性を明らかにすることを目的とした。IMQ を Balb/c マウス耳介に塗布することで誘発される耳介の肥厚が MabE の局所投与により抑制された。また、炎症局所における炎症関連メディエーターの遺伝子発現を確認した結果、IMQ 塗布で生じる IL-17A 等の遺伝子発現量の増加が MabE 処置群の耳介では有意に抑制されることが明らかとなった。さらに耳介凍結切片を用いた免疫組織化学染色の結果から、IMQ 塗布により炎症局所での $\gamma\delta$ T 細胞が増加し、その細胞数の増加が MabE 処置に

より減少することが示された。このことから、本モデルにおける主要な IL-17A 産生細胞は $\gamma\delta$ T 細胞であり、MabE の局所投与により $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤および IL-17A 産生が抑制されることが示唆された。次に、皮膚を起点とした全身性免疫に対する MabE の作用を明らかとするため、IMQ 耳介塗布後の脾臓における $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17A 産生への MabE の効果を検討した。脾臓から回収したリンパ球を用いフローサイトメトリー解析を行った結果、IMQ 塗布群の脾臓では未処置群と比較し $\gamma\delta$ T 細胞の顕著な増加が観察され、これは MabE 処置群で有意に抑制された。一方で IL-17A 産生型である CD27^{lo} $\gamma\delta$ T 細胞および細胞内染色により評価した $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17A 産生については、IMQ 塗布による $\gamma\delta$ T 細胞中の割合増加が認められたものの、MabE 処置による影響は観察されなかった。さらに、脾臓細胞を PMA/Ionomycin A で刺激することで産生される IL-17A を定量した結果、IMQ 塗布群の脾臓でみられる IL-17A 産生が MabE 処置群で抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、IMQ 塗布により活性化される全身性の免疫反応が MabE の耳介局所投与により抑制されることを意味しており、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。MabE の抗炎症作用に加えて、IMQ 塗布の 10 日前から FBRA 含有食を摂取させることで、IMQ 塗布により生じる耳介の肥厚が有意に抑制された。耳介局所における IL-17A や COX-2 等の遺伝子発現も FBRA 摂取群で有意に抑制された事から、FBRA が IMQ で誘発される皮膚炎に対し抑制効果を示すことが明らかとなった。以上の結果から、MabE および FBRA が炎症性皮膚疾患の治療もしくは予防において有用となることが示唆された。

参考文献：

1. Umeyama L, Hardianti B, Kasahara S, Dya Fita D, Awale S, Yokoyama S, Hayakawa Y: Anti-inflammatory effects of Morus alba Linne bark on the activation of toll-like receptors and imiquimod-induced ear edema in mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021;21(1):115. doi: 10.1186/s12906-021-03291-5.
2. Umeyama L, Kasahara S, Sugawara M, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y: Anti-inflammatory effects of fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) on mice. *Traditional & Kampo Medicine*, 2021;8(1):60-65. doi: 10.1002/tkm2.1270

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	梅山 凜
審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授	氏 名 久米 利明 櫻井 宏明 早川 芳弘	  
(論文題目) 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 (Application of traditional medicines in the control of biological barrier function and inflammatory disease)		(判定) 合 格	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>近年、がんや糖尿病、認知症などの神経変性疾患、自己免疫疾患など様々な疾患の発症や重症化における慢性炎症の重要性が明らかとなってきた。慢性炎症の関与する疾患は主に対症療法が治療の主体であり、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いる。和漢薬の使用により、それ自身の治療効果に加え、ステロイド等既存治療の減量も期待できることから、炎症性疾患の治療に対する適切な和漢薬の利用が望まれるが、薬理作用や治療効果における科学的エビデンスの不足から臨床適応が困難となる場合も多い。それ故、和漢薬の薬理作用や作用機序を明らかとすることは、炎症性疾患を対象とした治療への応用を目的とする上で非常に重要となる。</p> <p>以上の背景から、本論文では自然免疫細胞の活性化に対する桑白皮エキス (<i>Morus alba</i> L. bark extract: MabE) の効果を明らかとし、さらに桑白皮ならびに発酵玄米食品であるFBRA (Fermented Blown Rice with <i>Aspergillus oryzae</i>) の炎症性皮膚疾患に対する薬理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研究成果を以下の2章にまとめた。</p> <p>第1章として自然免疫細胞のマクロファージについて、Toll様受容体 (TLR) 介した炎症性シグナルの活性化に対するMabEの効果について、発現場所や関与する補助因子の異なるTLRとしてTLR3, 4, 7に着目し、それぞれのリガンドであるpolyI:C, LPS, Imiquimod (IMQ)を用いて検討を行った。マウス由来マクロファージ様細胞株RAW264. 7細胞のNF-κB応答性ルシフェラーゼ遺伝子安定発現株RAW264. 7-NFκB-Luc2細胞を用いたレポーターアッセイやタンパク定量によって、各TLR刺激で誘導されるNF-κB活性化が、MabEにより抑制されることを示した。加えて、各TLRリガンドによるMAPK経路の活性化に対してもMabEが抑制効果を示すことを明らかにした。次に、NF-κBやMAPK経路の活性化により誘導される炎症性サイトカインの産生について、遺伝子発現とタンパク産生いずれもがMabEにより抑制されることを示した。さらに、MabE中に含まれるMoracin OおよびMoracin Pの二つの化合物によってTLRリガンドにより誘導されるNF-κBレポーター活性の上昇が抑制されることが明らかとした。これらの結果から、TLRを介し活性化される自然免疫反応がMabEおよびMoracin O, Moracin Pにより抑制されることが明らかとなり、その抑制効果は特定</p>			

のTLRに依存しないことが示唆された。

第2章として炎症性皮膚疾患モデルに対する和漢薬の有用性について、ヒト乾癬患者と同様にIL-17A依存的な乾癬様皮膚症状を呈することが知られているIMQ誘発マウス乾癬モデルを用い、桑白皮および発酵玄米食品 (FBRA) の薬効・薬理作用を検討することで、難治性皮膚疾患に対する和漢薬の有用性について示した。IMQのマウス耳介に塗布により誘発される耳介の肥厚がMabEの局所投与により抑制され、炎症局所における炎症関連メディエーターの遺伝子発現の増加もMabE処置群の耳介では有意に抑制された。また、免疫組織化学染色によってIMQ塗布により炎症局所での $\gamma\delta$ T細胞が増加し、その細胞数の増加がMabE処置により減少すること、本モデルでの主要なIL-17A産生細胞が $\gamma\delta$ T細胞であり、MabEの局所投与により $\gamma\delta$ T細胞の浸潤およびIL-17A産生が抑制されることを示した。さらに、皮膚を起点とした全身性免疫に対してもMabEの抗炎症作用が認められた。IMQ塗布群の脾臓では未処置群と比較し $\gamma\delta$ T細胞の顕著な増加が観察されたが、これはMabE処置で有意に抑制され、加えて脾臓細胞から産生されるIL-17AがMabE処置群で抑制されることも明らかとした。これらの結果は、IMQ塗布により活性化される全身性の免疫反応がMabEの耳介局所投与により抑制されることを意味しており大変重要である。続いて、IMQ塗布の10日前からFBRA含有食を摂取させることで、IMQ塗布により生じる耳介の肥厚が有意に抑制された。耳介局所におけるIL-17AやCOX-2等の遺伝子発現もFBRA摂取群で有意に抑制されたことから、FBRAがIMQで誘発される皮膚炎に対し抑制効果を示すことが明らかとなった。以上の結果から、MabEおよびFBRAが炎症性皮膚疾患の治療もしくは予防において有用であることが示唆された。

以上、本研究は和漢薬によって免疫系をはじめとする生体バリア機能の制御により、様々な疾患の原因となる慢性炎症を基盤とする疾患への治療が可能であることを示しており、今後これらの難治性疾患の治療に大きく貢献することが期待できる。

主査及び副査は、申請者 梅山 凜 氏の本学位論文の内容を精査するとともに面接審査を行い、梅山 凜 氏が博士(薬科学)の学位を受けるに十分に値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

1. 著者名: Lin Umeyama, Besse Hardianti, 2, Shiori Kasahara, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa

論文題目: Anti-inflammatory effects of Morus alba Linne bark on the activation of toll-like receptors and imiquimod-induced ear edema in mice

雑誌名・巻・頁・年: BMC Complementary Medicine and Therapies, in press

2. 著者名: Lin Umeyama, Shiori Kasahara, Misa Sugawara, Satoru Yokoyama, Ikuo Saiki, Yoshihiro Hayakawa

論文題目: Anti-inflammatory effects of fermented brown rice and rice bran with Aspergillus oryzae (FBRA) on mice

雑誌名・巻・頁・年: Traditional & Kampo Medicine, in press (1st Published Online, Dec 1st, 2020), <https://doi.org/10.1002/tkm2.1270>