



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	補中益気湯は肺炎球菌保菌マウスモデルにおいてマクロファージ活性化とIL-17A産生亢進を介してクリアランスを向上させる [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	中久保, 祥
Description	配架番号 : 2546
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14081号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78031
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sho_Nakakubo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



(様式 9)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 中久保 祥

学 位 論 文 題 名

補中益気湯は肺炎球菌保菌マウスモデルにおいてマクロファージ活性化と
IL-17A 産生亢進を介してクリアランスを向上させる

(Traditional Japanese Herbal Medicine Hochu-ekki-to Promotes
Pneumococcal Colonization Clearance via Macrophage Activation and
Interleukin 17A Production in Mice)

【背景と目的】肺炎球菌は感染症学領域では古典的な存在のグラム陽性球菌だが、昨今でも市中肺炎で最も頻度の高い原因菌であり、髄膜炎や菌血症などの致命的な侵襲感染症をおこす。抗菌薬が普及した現在でも高い罹患率と死亡率であり、世界的に重い疾病負荷をかけている。肺炎球菌ワクチン戦略で小児と高齢者の侵襲感染症が減少した一方で、血清型の疫学変化やワクチン非カバー株による感染症の増加が報告され、新たな課題に局面している。ワクチン以外の新しい予防戦略が望まれている。肺炎球菌は鼻腔内に定着し、保菌状態になり、次いで感染症や周囲への伝播を引き起こす。そのため、保菌を制御することが、肺炎球菌予防戦略において重要である。肺炎球菌を保菌すると宿主の動的な自然免疫と獲得免疫の相互作用が介在し、保菌のクリアランスが導かれていくことがわかっている。免疫系に作用し、保菌のクリアランスを高めるような薬剤が肺炎球菌感染症の予防として有望である。我々は今回漢方薬に着目し、その中でも過去に免疫賦活作用が報告されている補中益気湯（TJ-41）に注目した。肺炎球菌保菌モデルにおけるその効果を検証し、細胞実験を行いその機序の解明に取り組んだ。

【材料と方法】TJ-41 は、エキス乾燥粉末製剤を、適宜溶解して利用した。マウスを用いて、肺炎球菌の鼻腔内保菌モデルを確立した。同モデルに対して、保菌前 2 週から保菌後 4 週まで TJ-41 の経口投与を行うことで、肺炎球菌の鼻腔内保菌量に対する効果を検証した。また、その背景を深めるため、フローサイトメトリーや real time PCR 法を用いて細胞解析、遺伝子解析を行った。Interleukin 17A (IL-17A) knock out (KO)マウスを用いて、同様に保菌モデルへの効果を検証した。マウスモデルで得られた知見をさらに深く検証するため、細胞実験を行った。マウスの鼻腔内細胞を分離し、白血球を well に接種し、殺菌処理を施した肺炎球菌抗原（WCA）と TJ-41 を投与し、その後の細胞の状態変化をフローサイトメトリーで解析し、マクロファージの貪食能の変化を検証した。同実験系を用いて、WCA と TJ-41 による IL-17A messenger RNA (mRNA)の発現の変化を測定した。TJ-41 のマクロファージへの効果を検証するため、cell line のマクロファージを中心に、肺炎球菌貪食能、殺菌能を測定した。最後に、TJ-41 のもたらすマクロファージの肺炎球菌抗原提示能への効果を確認するため、T 細胞を用いて IL-17A の産生量を ELISA で測定した。

【結果】TJ-41 を投与した肺炎球菌保菌マウスでは、control マウスと比較して、保菌後 14 日目、28 日目の時点の鼻腔内菌量が有意に減少し、TJ-41 が保菌クリアランスを高めることが判明した。同時点の鼻腔内細胞のフローサイトメトリーによる解析では、TJ-41 投与群のマクロファージ数と CD86 陽性の活性型マクロファージ数がいずれも control 群よりも有

意に高くなっていた。また、保菌後 28 日の鼻腔関連リンパ組織（NALT）中の IL-17A 産生 T 細胞の割合が、TJ-41 群で大幅に上昇していた。これらの実験を、IL-17A KO マウスで同様に検証した結果、両群で鼻腔内菌量に差は見られず、TJ-41 群のマクロファージ数の上昇も見られなかった。TJ-41 の保菌クリアランスを高める作用機序としてマクロファージと IL-17A の関わりが推定された。鼻腔内細胞を用いた細胞実験では、WCA に曝露した群で、TJ-41 を投与した群は control 群に比して 3 日目の活性型マクロファージのカウント数が有意に上昇しており、マクロファージの肺炎球菌貪食能を測定したところ、TJ-41 群の方で貪食能が高い結果が得られた。一方で同じ実験系を IL-17A KO マウスの細胞を用いて行ったところ、TJ-41 群と control 群の間で、活性型マクロファージの数も、肺炎球菌貪食能も差は見られなかったため、TJ-41 のマクロファージ活性化と貪食能向上には IL-17A が必須であることが判明した。同じく鼻腔内細胞を用いた実験で IL-17A mRNA の発現を測定したところ、WCA 曝露群間で TJ-41 投与群は control 群に比して IL-17A mRNA の発現が有意に高い結果が得られた。この現象は、事前にマクロファージを薬剤で除去したのちに行うと、観察されなくなり、マクロファージの機能制御が IL-17A 産生の亢進に必要であることが推察された。Cell line を用いたマクロファージへの TJ-41 による直接効果を検証した結果、TJ-41 を投与すると肺炎球菌貪食能、殺菌能が上昇することがわかった。また、マクロファージからの抗原提示量を、接触する T 細胞からの IL-17A 産生量で評価したところ、TJ-41 投与群で有意に高い結果が得られ、マクロファージの抗原提示能も上昇させることがわかった。

【考察】TJ-41 が、肺炎球菌保菌モデルにおいて保菌のクリアランスを高めることが示された。これはすなわち肺炎球菌の感染症への進展や周囲への伝播のリスクを下げる可能性を秘めており、新規の肺炎球菌予防戦略として期待できる。今後、ヒトでの検証を行うことが課題である。肺炎球菌を保菌している状態もしくは肺炎球菌抗原に曝露した状態で TJ-41 を作用させると、鼻腔内細胞で IL-17A 産生が亢進する現象が確認され、IL-17A の相対的な高まりが、鼻腔内のマクロファージを相加的に活性化し、肺炎球菌の貪食、クリアランスの向上につながっていることが推察される。肺炎球菌保菌モデルにおいて、内因性の IL-17A の上昇がクリアランスを高める知見は本研究の新規性の一つである。TJ-41 が IL-17A を高める機序として、マクロファージが必須であることが示され、マクロファージへの直接効果を検証した結果、肺炎球菌貪食能、殺菌能の向上に加え、T 細胞への抗原提示能を上昇させることもわかった。TJ-41 は、マクロファージを活性化し抗原提示を活発に行わせ、続く T 細胞からの IL-17A 産生を中心として免疫応答を賦活化することが作用機序と推察された。TJ-41 の IL-17A に関連した免疫学的機序は既報にはない。また、肺炎球菌の保菌に関する研究で、自然免疫系を賦活化することが、より高い T 細胞系の免疫応答をもたらすことを示した報告もこれまでになく、これらは本研究の新規性である。

【結論】肺炎球菌保菌マウスモデルと細胞実験を用いることで、TJ-41 の肺炎球菌保菌クリアランスにおける保護的な効果を示し、その背景にある免疫学的な機序を明らかにした。TJ-41 は肺炎球菌予防戦略として有望であり、TJ-41 の今後の臨床応用の拡大を見据えて、さらなる究明や知見の蓄積が望まれる。また本研究を通して、漢方薬の科学的解明に、また、肺炎球菌保菌の機序解明に寄与することができた。