

# 大腸におけるインターフェロン $\alpha$ の 産生に対する十全大補湯の作用： MyD88、TLR4 ノックアウトマウスを用いた解析

慶應義塾大学医学部漢方医学センター

皆川紗代、宗形佳織、渡辺賢治

**消化と吸収**  
Digestion & Absorption

Vol. 32 No.2 '09 別刷

# 大腸におけるインターフェロン $\alpha$ の 産生に対する十全大補湯の作用： MyD88、TLR4 ノックアウトマウスを用いた解析

慶應義塾大学医学部漢方医学センター

皆川紗代、宗形佳織、渡辺賢治

## 諸言

近年、SARS (severe acute respiratory syndrome：重症急性呼吸器症候群) や新型インフルエンザA (H1N1) などの新興感染症や、薬剤耐性菌が問題となり、新たなタイプの薬剤が求められている。漢方薬は宿主側の生体防御能を向上させることによって感染を防御する可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。我々は、応用範囲が広く、臨床的にも汎用されている漢方薬である十全大補湯 (以下、JTT) に注目して検討を始めた。これまでJTTの作用に関する研究は臨床研究および基礎研究において報告されているが、複数生薬からなり多様な成分を含む<sup>2)</sup> ことから、多様な作用を持つ可能性があるJTTの作用および作用機序を多面的に検討した例は少ない。そこで、これまでに我々はJTTを網羅的解析手段の一つであるGene ExpressionのMicroarray Analysisを用いて作用の検討を行った<sup>3,4)</sup>。これにより、JTTが大腸においてもっとも大きな影響を与える遺伝子群としてI型インターフェロン (以下、IFN) 関連遺伝子を見出した。また、大腸のIFN  $\alpha$ が感染防御の第一線として働く可能性を示唆してきた<sup>5)</sup>。さらに、C57BL/6マウスについてはJTT投与により、I型IFN関連遺伝子の発現レベルが上昇し、IFN誘導剤によるIFN  $\alpha$ 産生を早める効果があることを明らかとした。

現在、IFN  $\alpha$ 産生については2 step modelが知られており、toll like receptor (以下、TLR) sを介するEarly Phaseと、IFN  $\alpha$ receptor (IFNAR)を介するLate Phaseからなる。このように細菌や病原体由来の物質を認識するTLR3、4、7、9はIFN  $\alpha$ 産生の重要なトリガーであるため、漢方薬による感染防御能の増強にはTLRsの関与が考えられる。そこで今回は、グラム陰性菌由来のエンドトキシン (LPS) をはじめとするさまざまな微生物成分、植物成分を認知するTLR4、およびTLR3を除くほぼすべてのTLRsのアダプター分子としてシグナル伝達に大きな役割を持つMyD88に注目し、これらのノックアウトマウスにおける十全大補湯の作用を検討した。

## 対象

対象は7週齢雄性C57BL/6マウス、同系統のMyD88 KOマウスおよびTLR4 KOマウスを用いた (n = 6~10)。水餌ともに自由摂取とし、飼育室の温度は23±1℃、明期は9:00 a.m. ~ 11:00 p.m. に設定した。

## 方法

TLR4 KOマウス・MyD88 KOマウス・C57BL/6マウス (野生型)、およびこれらにJTT 1.0 g/kgを2週間連続強制経口投与したもの

について、大腸におけるI型IFN関連遺伝子の発現レベルをRT-PCRにより測定した。I型IFN関連遺伝子としては、IFN alpha産生における転写因子複合体ISGF3の構成要素であるStat1、Stat2、IRF9、およびIFN alpha産生を直接的に誘導するIRF7を選択した。

成績

RT-PCRによる測定の結果、上記の4遺伝子(Stat1、Stat2、IRF9、IRF7)についてはほぼ同様の傾向が認められた(図1)。

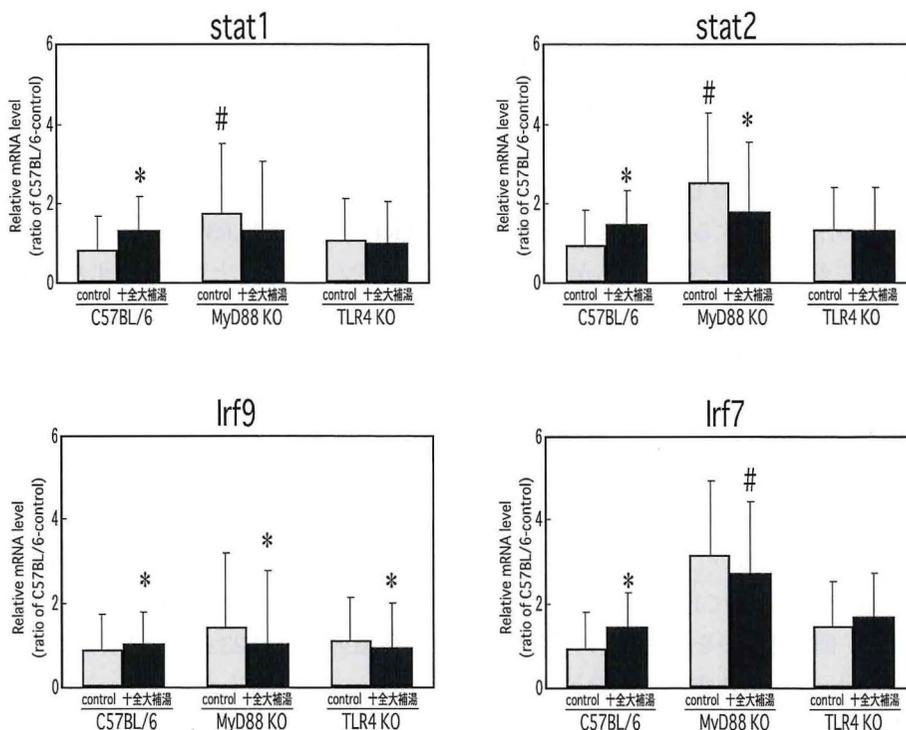
各系統のマウスについてコントロール群とJTT群とを比較すると、C57BL/6マウスについてはJTT投与によって発現が有意に増加するこ

とが認められた。MyD88 KOマウスについては明らかな減少傾向が認められた。TLR4 KOマウスについては変化傾向は認められなかった。

各系統マウスのコントロール群(定常状態)どうしを比較すると、C57BL/6マウスを基準として、MyD88 KOマウスでは顕著な増加が認められた。TLR4 KOマウスでは変化が認められなかった。

考按

JTT投与の影響において、C57BL/6マウスでは有意な発現増加が認められたのに対し、MyD88 KOマウスでは逆に減少傾向が認められた(図1)ことから、MyD88 KOマウスでは



student ttest or Sceheffe significant defines as <0.05  
 \* vs control  
 # vs C57BL/6-control  
 mean±S.D.(n=6-10)

図1 ノックアウトマウスの大腸におけるI型IFN関連遺伝子の発現レベル

C57BL/6マウスと作用方向は異なるもののJTTによる効果が認められたことがわかる。一方、TLR4 KOマウスではJTT投与による発現変化が認められなかった。以上のことから、JTTはTLR4依存性MyD88非依存性経路に作用する可能性が示唆された(図2)。

KOによる影響については、各系統マウスのコントロール群(定常状態)どうしの比較により、野生型であるC57BL/6マウスに比べて、MyD88 KOマウスでは顕著な発現増加が認められた(図1)ことから、MyD88遺伝子のKOはI型IFN関連遺伝子の顕著な発現増加を引き起こしたことがわかる。定常状態におけるI型IFN関連遺伝子の発現増加は我々が以前行った無菌マウスとSPFマウス(IQI系統)でも観察されて

おり<sup>5)</sup>、腸内細菌の有無は、I型IFN関連遺伝子の発現に大きな影響を与えられと考えられる。一方、MyD88 KOマウスは腸内細菌を有するが、微生物成分等を認識するTLRsの主要なアダプター因子であるMyD88を欠損していることにより、微生物等による刺激が広範に欠落している状態であると考えられよう。その両者において同様にI型IFN関連遺伝子の発現が増加していたことは、腸内細菌は大腸のIFN産生レベルを決定する重要な因子であることを示唆している。

結論

JTTはTLR4依存性MyD88非依存性経路に作用すること、腸内細菌が大腸のIFN alpha産生能に重要な影響を与えること、が示唆された(図2)。

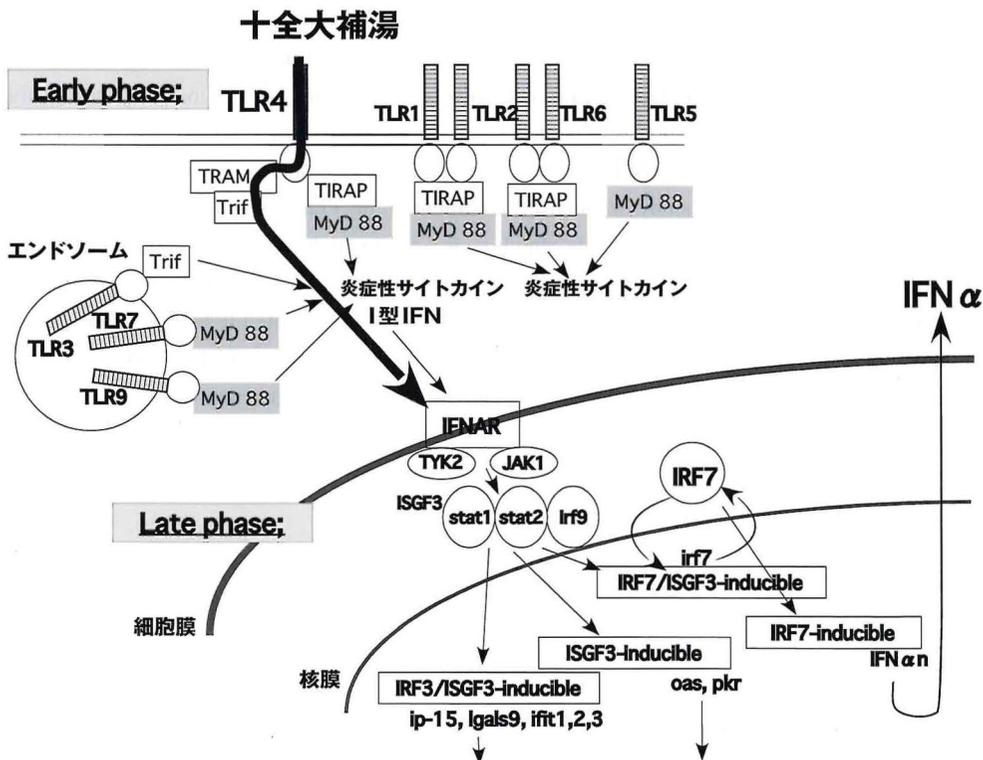


図2 TLR4依存性MyD88非依存性IFN alpha産生経路

[参考文献]

- 1) Kazuya M, Toshitaka K, Haruyuki D, et al: Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine, on the survival of mice infected with influenza virus. *Antiviral Research* **44**: 103-111, 1999
- 2) Saiki I, Yamaura T, Ohnishi Y, et al: HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **Aug; 47 (8)**: 1170-1174, 1999
- 3) Anjiki N, Hoshiono R, Ohnishi Y, et al: A Kampo formula Juzen-taiho-to induces expression of metallothioneins in mice. *Phytother Res* **Oct; 19 (10)**: 915-917, 2005
- 4) Kato M, Ishige A, Anjiki N, et al: Effect of herbal medicine Juzentaihoto on hepatic and intestinal heat shock gene expression requires intestinal microflora in mouse. *World J Gastroenterol*. **Apr 28; 13 (16)**: 2289-2297, 2007
- 5) Kaori M, Masahiro Y, Naoko A, et al: Importance of the interferon- $\alpha$  system in murine large intestine indicated by microarray analysis of commensal bacteria-induced immunological changes. *BMC Genomics* **9**: 192, 2008

## The effect of Juzen-taiho-to on interferon-alpha production in the large intestine : the roles of MyD88 and TLR4

Sayo Minagawa, Kaori Munakata, Kenji Watanabe

Center for Kampo Medicine, Keio University School of Medicine

### Abstract

Juzen-taiho-to (JTT) is widely used for anemia, rheumatoid arthritis, chronic fatigue syndrome and the prevention of cancer metastasis and infection in immuno-compromised patients. By transcriptome analyses, we have previously shown that the type I interferon (IFN)-related genes are the most affected genes by the administration of JTT. The production pathway of IFN-alpha is known as two-step model, which consists of toll-like-receptor (TLR) s-mediated "Early Phase" response and IFN-alpha receptor (IFNAR)-mediated "Late Phase" response. In the present study, we focused the attention on TLR4, which recognizes a vast variety of microbial and plant components, and Myd88, which is an adaptor molecule of most TLRs except TLR3. We measured the mRNA levels of type I IFN-related genes in large intestine (LI) of TLR4-KO mice and MyD88-KO mice and wild-type mice (C57BL/6) by RT-PCR. JTT-treatment upregulated IFN-related genes' expression of wild-type mice, downregulated that of MyD88-KO mice, did not regulate of TLR4-KO mice. The present study suggests that JTT act on the TLR4-dependent-MyD88-independent signal pathway.