

# 免疫制御を可能にする生薬由来成分の探索研究

(申請代表者) 松田達志 関西医科大学附属生命医学研究所生体情報部門 准教授

## 「背景・目的」

今や国民病とも呼ばれる花粉症は、感染の脅威から個体を守るべき免疫系が、本来は無害な花粉由来の抗原に過剰に反応することで引き起こされる。また、近年の解析から、肥満に伴うインシュリン抵抗性糖尿病など、各種の生活習慣病の背景に免疫担当細胞の異常な活性化が関与することも明らかにされつつある。実際、これら病態の治療には、「免疫抑制剤」が使用されており、大きな治療効果を上げている。しかし、免疫抑制剤は広く免疫系全般の反応を抑えるため、重大な副作用として日和見感染症等の問題が生じることになる。臓器移植や自己免疫疾患など生命の危機に直結する治療とは異なり、生活習慣病や花粉症の治療を考える上では、リスク・ベネフィットの観点から、より副作用の少ない免疫制御法の開発が望まれている。

従来の免疫抑制剤の多くは、タクロリムス(FK506)やシクロスポリンに代表されるように、免疫細胞の中でも特にT細胞の活性化とそれに引き続く増殖を阻害することで薬理作用を発揮している。すなわち、獲得免疫系の司令塔であるT細胞の活性を全体的にオフにすることで、病態の発症をブロックするという考え方に基づく治療戦略である。一方、各種の免疫病態の背景には、むしろ疾患特異的なT細胞の機能亢進が存在しているものと考えられる。すなわち、I型糖尿病におけるTh1反応の亢進、多発性硬化症やクローン病等におけるTh17反応の亢進、さらにアレルギー性疾患においてはTh2反応の亢進が認められる。これら病態の原因となるT細胞を消失させることができれば、免疫系全般を阻害する必要なく、病態の改善が可能になるものと期待される。

研究代表者は、ごく最近、この新しい治療戦略を可能にする現象を2つ見出している。すなわち、T細胞分化を質的に制御する樹状細胞の機能をPI3K-mTORC1経路が制御しているという発見と、MAPKK-Kファミリーの一員であるTAK1が活性化したT細胞特異的な生存維持機構を制御しているという発見である。樹状細胞を対象に前者の経路を制御することができれば、例えばTh2細胞分化を抑制しつつTh1細胞分化を亢進させることが可能になるものと期待される。一方、T細胞を対象にTAK1経路を阻害することができれば、感染症に対処すべきT細胞プールそのものは適切に維持したまま、種々の免疫病態の原因となる活性化T細胞のみを消失させることが可能になる。本研究では、これら研究代表者の見出した知見に基づき、樹状細胞を対象にしたサイトカインバランス制御に関わる薬剤の同定と、T細胞を対象としたTAK1経路の阻害剤同定を通じて、生薬由来成分による「免疫制御」の可能性を検証する。

## 「結果・考察」

当初の研究構想では、供与されるライブラリー存在下に、樹状細胞由来のIL-12(炎症性サイトカイン:Th2分化を抑制)ならびにIL-10(抑制性サイトカイン:Th1分化やTh17分化など、自己反応性T細胞の分化を抑制)の産生バランスが影響を受けるか否かを検証すると共に、T細胞におけるTAK1シグナル阻害作用の有無を検証する予定であった。しかし、ランダムに選択した数種類の化合物ならびに生薬エキスをを用いて、アッセイ系の予備的な評価を行ったところ、樹状細胞を用いた解析に問題が生じたため、実施を断念することにした。具体的には、マウス骨髄から分化させた樹状細胞を精製した後、候補薬剤の共存下にLPS刺激を加え、24時間後に培養上清を回収して、産生されるIL-10ならびにIL-12の量をELISA法で定量した。ポジティブコントロールに用いたラパマイシンでは、LPS単独処理細胞に比べ、IL-12の産生上昇が見られると共にIL-10の産生低下が誘導されたのに対し、予備検討に用いた薬剤では、何れのサイトカインについても産生が認められなかった。培養後の細胞形態を調べてみると、生薬ライブラリーを加えたウェルでは大きく細胞が傷害されていることが分かった。は

っきりした原因は不明であるが、経験的にプライマリーの樹状細胞は各種の薬剤処理に感受性が高い傾向にあることから、24時間という長時間におよぶ薬剤処理によって細胞に大きな負荷がかかった可能性が考えられた。薬剤の希釈系列に対して効果を検証する方法も考えられたが、一回当たりのアッセイに必要な試薬が非常に高価なため、現状のプロトコールで網羅的な解析を行うことは困難と判断して、細胞傷害の影響をほぼ無視して評価することが可能なT細胞のアッセイに注力することとした。

これまでの解析から、T細胞の活性化過程においてTAK1経路はJNK・p38経路の活性化に必須の役割を担うことが明らかとなっている。TAK1によって活性化されたJNK・p38経路は、転写複合体であるAP1の活性化を介してNFATプロモータの活性化を制御することから、NFATプロモータの活性を指標とすることで間接的にTAK1シグナルの阻害効果を評価することが可能である。そこで、ヒトT細胞株であるJurkat細胞に、NFATプロモータの支配下にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を導入し、候補化合物の共存下に活性化シグナルを与えることで、ルシフェラーゼの活性変動の有無を評価した。なお、T細胞の活性化シグナルとしては、候補化合物の二次的な効果の可能性を極力排除するために、TAK1の直上流でT細胞を活性化可能なPMAとIonomycinの組み合わせを用い、刺激後7時間で細胞抽出液を調製した後、ピッカジーン試薬を用いてルシフェラーゼ活性の定量を行った。候補化合物を添加しない状態で活性化シグナルを与えた場合のルシフェラーゼ活性を100%として、候補化合物を添加することでルシフェラーゼ活性がどのように増減するかを評価した。その結果、生薬エキス112種の中では、#34(牛蒡子)ならびに#62(桑白皮)が顕著なNFATプロモータ抑制活性を示すことが分かった。一方、含有化合物ライブラリー96種を調べたところ、#5(Alkannin)、#19(Bisdemethoxycurcumin)、#20(Bufalin)、#21(Bufotalin)、#27(Cinobufagin)、#28(Cinobufotalin)、#87(Saikosaponin d)、#91(Shikonin)が著しい抑制活性を示した。これら化合物の中でTAK1活性への効果が報告されたものはないが、含有化合物#19のBisdemethoxycurcuminはCurcuminのderivativeであり、CurcuminはMAPK経路の阻害剤として機能することから、本アッセイ系の妥当性が強く示唆される。今回のスクリーニングでは、NFAT promoter活性を通じてTAK1活性を間接的に評価しただけであるが、TAK1はMAPK以外にNF- $\kappa$ B経路の活性化にも関わることが知られており、今回見出された薬剤が同じくNF- $\kappa$ B経路の阻害効果を発揮するか否か、興味を持たれる。最終的にTAK1阻害剤の同定を目指すためには、恒常活性型のTAK1の過剰発現に伴うMAPK活性化シグナルを指標にするなどして、TAK1阻害効果の有無を直接的に検証する2次スクリーニングの系が必要になるものと思われる。なお、生薬エキスの阻害効果に比べ、含有化合物がはるかに高い阻害効果を示しているのは、生薬エキスに含まれる有効成分のモル濃度が相対的に低くなっているためと考えられる。今回は、予算の関係から、希釈系列を用いたアッセイにまで手が回らなかったが、今回見出された薬剤を対象とした2次スクリーニングに際しては、1 mg/mLの高濃度を用いてアッセイを行う予定である。

今回のスクリーニングを通じて意外だったのは、NFAT活性を数倍程度にまで上昇させる化合物が複数散見された点である。PMAとIonomycinによるT細胞活性化シグナルは非常に強力なため、それをさらに上昇させる化合物が存在する事実は、シグナル伝達の視点から見て非常に興味深い。本来の解析の目的とは異なるが、このNFAT活性上昇がどのような分子機序によって引き起こされているのか、また実際のT細胞機能にどのような影響を与えるかなど、今後解析を進めてみたい。

## 「結論」

免疫反応の制御に重要な樹状細胞ならびにT細胞を対象に、生薬由来化合物がこれら免疫担当細胞の機能に影響を及ぼしうるか否か、スクリーニングを行った。樹状細胞についてはアッセイ上の制約から想定していたスクリーニングを実行するには至らなかったが、T細胞の活性化過程を顕著に抑制可能な複数の候補化合物を得ることができた。今後、2次スクリーニングを実施することで、生理的なT細胞機能を制御可能な「免疫制御薬」の発見に結びつけたい。