

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：83206
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659247
 研究課題名（和文） アレルギーおよび非感染性炎症の時空間的制御と植物由来化合物による調節
 研究課題名（英文） Spatiotemporal control of allergy and non-infectious inflammation and their regulation by natural products
 研究代表者
 高津 聖志（TAKATSU KIYOSHI）
 富山県薬事研究所・所長
 研究者番号：10107055

研究成果の概要（和文）：

- IL-5 を蛍光蛋白質に置き換えたマウスを作出し、恒常的に IL-5 を産生する新たな細胞集団(原始 IL-5 産生細胞)を同定した。
- 肥満時に脂肪組織で発現が増加する分子、RP105 を見出した。
- 免疫制御を解析する評価系を確立し、植物由来化合物をスクリーニングした結果、抗アレルギー薬、免疫賦活剤、糖尿病薬として期待される化合物を得た。
- 得られた化合物の作用機序の一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

- We identified innate IL-5-producing cells by using the IL-5 reporter mice.
- RP105 expression dramatically increased in the adipose tissue from high-fat diet fed mice and obese subjects.
- We established assay systems useful for analyzing immune regulation, and evaluated the natural compounds for their regulatory effects on the immune system. As a result, we identified several compounds as medicinal seeds useful for an allergy medication, an immune-stimulator, and an anti-diabetic drug.
- We find mechanisms, in part, by which these compounds regulate the immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・免疫関連疾患

1. 研究開始当初の背景

高齢者に増えつつある免疫病や代謝疾患の早期発見、予防薬や治療薬の開発が期待されている。免疫制御のバランスを人為的に調節し、免疫・炎症疾患の発症頻度を低くすれば、その重症化予防と早期治療につながる。

外来性、内因性のストレスに対応して植物が産生する化合物の多くは微量で哺乳類の細胞内の各種レセプターに作用し生理作用を発揮し、ゼノホルメーシスとして最近注目を浴びている。サリチル酸誘導体は解熱剤として、タキソールは制がん剤として、タミフルは抗インフルエンザ薬として利用されるなど、現

在処方されている医療用医薬品の約1/3 の起源は植物である。

我々は、これまでの研究から免疫応答や非感染性慢性炎症の誘発に関与する免疫担当細胞や炎症細胞を標的にした、天然化合物の独自評価系を確立している。その系を用いて、免疫炎症および非感染性慢性炎症の制御とその破綻のメカニズムを解明し、それらに有効な植物成分を含む天然物成分を探索しその作用機序を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点である。

(1) 免疫ネットワークの時空間的な調節機構を明らかにし、アレルギーや炎症の制御および破綻の分子機構を解析し、慢性炎症性疾患の発症に関与するバイオマーカーを確立する。それにより炎症の発症と慢性化の予防法の開発に寄与する。

(2) アレルギーや非感染性炎症を制御する薬物の試験管内評価系を利用し、有用な植物由来化合物を探索するとともに、生体内での動態と有効性や作用機序を既知の医療用医薬品と比較する。

3. 研究の方法

我々が独自に開発した免疫や非感染性慢性炎症系の *in vitro* 評価系を利用し、抗原提示細胞 (APC) を活性化して抗原交叉提示を増強しがん免疫の増強をする化合物、IL-5 や IgE 産生を抑制する化合物、樹状細胞による TNF α 産生を抑制する化合物、IL-1 β による膵臓 β 細胞のアポトーシスを抑制する化合物を探索する。また、有効な化合物を *in vivo* で探索する評価系を独自に確立する。スクリーニングには、既存の入手可能な天然物ライブラリーや生薬由来の天然化合物、*in vitro* での予試験で強い有効性を確認できた 30 種類の化

合物やその誘導体を利用する。

4. 研究成果

(1) 免疫応答と非感染性慢性炎症の時空間的制御の解析

① IL-5-venus ノックインマウスを作出することに成功し、恒常的に IL-5 を産生する原始 IL-5 産生細胞を同定した。アレルギーの誘発因子の IL-33 を IL-5-Venus ノックインマウスに投与したところ、肺において原始 IL-5 産生細胞と好酸球が顕著に増殖することを見出した。

② 高脂肪食摂餌によるマウス肥満モデルにおいて、脂肪組織における TLR ファミリー分子 RP105 の発現が 10 倍以上に増加することを見出した。

(2) 免疫制御の *in vitro* 評価系を利用した有用シーズの探索

① IL-5-Venus ノックインマウス由来 T 細胞を用いた *in vitro* 評価系を確立し、IL-5 産生を抑制する化合物を見出した。この化合物は B 細胞の IgE 産生も抑制することから、アレルギーに対する医薬品シーズとしての展開が期待できる。

② Th1 依存性の APC 活性化による交叉提示能評価系を用い 1,500 種類以上の化合物を調べた結果、PKC 活性を持つ複数の天然薬物が Th1 依存性に抗原交叉提示を増強することを見出した。これらの天然薬物が *in vivo* でも Th1 依存性抗原交叉提示を増強することを確認した。

③ 生薬甘草成分のグリチルリチン及びイソリクイリチゲニンが、TLR4 リガンドによる TNF- α 及び IL-6 の産生を *in vivo* 及び *in vitro* で抑制する作用を見出した。また、その作用機序として、グリチルリチンは TLR4 と LPS の結合を抑制し、イソリクイリチゲニンは TLR4 と LPS の結合は抑制せず、その後

の TLR4 の二量体化を抑制することを明らかにした(図1)。

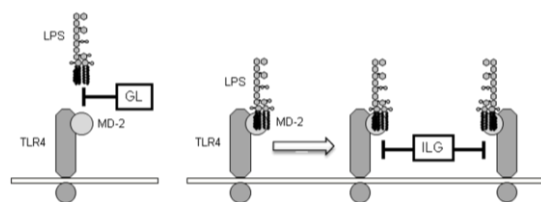


図1 グリチルリチン(GL)とイソリクイリチゲニン(ILG)の作用機序

④IL-1 β によるヒト株化細胞の細胞死を抑制するフラボン類などの複数の天然薬物を見出した。化合物Aの0.05%配合高脂肪食をマウスに給餌した結果、高脂肪食摂餌による肥満に伴い発現するインスリン耐性や高インスリン血症、高脂血症及び脂肪肝形成が改善された。これらの効果は、摂餌量の減少に伴う体重増加の抑制に一部起因しているものと推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Hayashi H, Fujii I, Miyake K, Muraguchi A, Takatsu K, Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor Toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner., J. Leukoc. Biol., 査読有, 91, 967-976 (2012)
DOI: 10.1189/jlb.0112038

(2) Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y, The radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation., Diabetes, 査読有, 61, 1199-1209 (2012)
DOI: 10.2337/db11-1182

(3) Sasaki S, Nagai Y, Yanagibashi T, Watanabe Y, Ikutani M, Kariyone A, Tsuneyama K, Hirai Y, Takatsu K, Serum soluble MD-1 levels increase with disease progression in autoimmune prone MRL/lpr-lpr mice., Mol. Immunol., 査読有, 49(4), 611-620 (2012)
DOI: 10.1016/j.molimm.2011.10.008

(4) Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K, Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity., J. Immunol., 査読有, 188, 703-713 (2012)
DOI: 10.4049/jimmunol.1101270

(5) Takatsu K, Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases., Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 査読有, 87(8), 463-485 (2011)
DOI: 10.2183/pjab.87.463

〔学会発表〕(計6件)

(1) 本田裕恵、Isoliquiritigenin and glycyrrhizin, representative components of Glycyrrhiza uralensis, inhibit activation of NALP3 inflammasome. 第41回日本免疫学会総会・学術集会、2012年12月6日、神戸国際会議場(兵庫県)

(2) 柳橋努、Characterization of innate IL-5-producing non-T cells in the large intestine regarding responsiveness to IL-33 and IgA production. 第41回日本免疫学会総会・学術集会、2012年12月7日、神戸国際会議場(兵庫県)

(3) 長井良憲、The RP105/MD-1 complex plays critical roles in diet-induced obesity and adipose tissue inflammation independent of palmitate-TLR4 signaling. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、幕張メッセ(千葉市)

(4) 刈米アイ、天然物によるTh1依存性交叉提示増強の探索 Various phorbol esters promote Th1-dependent antigen cross-presentation by APCs. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月29日、幕張メッセ(千葉市)

(5) 柳橋努、The major IL-5-producing cells in the intestine and lung are c-kit+

CD3ε⁺ cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉市）

（6）本田裕恵、甘草及びその成分は TLR4 を介した免疫応答を直接制御する Glycyrrhizae Radix and its components directly regulate TLR4-mediated immune responses. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ（千葉市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：インフラマソーム活性制御剤
発明者：高津聖志、平井嘉勝、長井良憲、松永孝之、本田裕恵
権利者：富山大学、富山県薬事研究所
種類：特許
番号：特願 2012-247766
出願年月日：2012 年 11 月 09 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
富山県薬事研究所
<http://www.toyama-yakuji.com>
富山大学大学院医学薬学研究部（医学）免疫バイオ・創薬探索研究講座
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津 聖志 (TAKATSU KIYOSHI)
富山県薬事研究所・所長
研究者番号：1 0 1 0 7 0 5 5

(2) 研究分担者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授
研究者番号：3 0 4 3 1 7 6 1
松永 孝之 (MATSUNAGA TAKAYUKI)

富山県薬事研究所・主幹研究員
研究者番号：3 0 1 2 1 2 8 9

(3) 連携研究者

刈米 アイ (KARIYONE AI)
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教
研究者番号：5 0 1 1 4 4 5 0
生谷 尚士 (IKUTANI MASASHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教
研究者番号：4 0 5 1 3 7 1 8
宮本 朋美 (MIYAMOTO TOMOMI)
富山県薬事研究所・主任研究員
研究者番号：2 0 4 4 3 4 2 6
本田 裕恵 (HONDA HIROE)
富山県薬事研究所・主任研究員
研究者番号：1 0 4 6 3 1 3 4