

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790109

研究課題名(和文) IgEレセプター発現抑制を作用メカニズムとする新規抗アレルギーリードの創製

研究課題名(英文) Creation of Novel Anti-allergic Leads Based on the Inhibition for Expression of IgE Receptors

研究代表者

田村 理 (Satoru, Tamura)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30362619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギーの発症は、症状を引き起こす炎症性分子がマスト細胞より放出されることで引き起こされるが、その放出はマスト細胞上の受容体にIgEというタンパクが結合し、さらにIgEがアレルギー(花粉など)に反応することが鍵となっている。私は、このマスト細胞上の受容体を発現抑制することでアレルギー反応が抑えられるのではないかと考え、培養マスト細胞を用いた活性評価系を構築し、受容体発現抑制物質としてchlorin e6を見出した。本化合物は、培養細胞に対してのみならず、ラットに経口投与することでラットのマスト細胞上の受容体量を抑制し、さらにアレルギー応答を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Allergy is caused by chemical mediators degranulated from mast cells. This degranulation is derived through the important two steps. In a first step, immunoglobulin Es (IgEs) are attached on the IgE receptors on the surface of mast cells. Then, the IgEs on mast cells react with invaded allergens in a second step. In this circumstance, I wondered that the decrease of IgE receptors on the mast cells may be able to suppress allergic reactions. Based on this idea, I established the assay system for evaluation of the amount of IgE receptors on the surface of cultured mast cells by immunofluorescence staining and flow cytometry. By the screening from medicinal plants for inhibitors against expression of IgE receptors, chlorin e6 was found as a potent inhibitor. Fortunately, chlorin e6 suppressed the expression of IgE receptors not only in vitro but also in vivo rat experiments. Finally, chlorin e6 was clarified to inhibit in vivo allergic reaction of rats through po administration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗アレルギー IgEレセプター マスト細胞 chlorin e6 RBL 2H3 pheophorbide a PCA反応

1. 研究開始当初の背景

アトピーや花粉症などのアレルギー症状を患う人の数は近年、急激な増加を見せており、その治療薬として抗ヒスタミン薬やステロイド剤が臨床で用いられている。しかし、抗ヒスタミン薬には副作用として眠気などの鎮静・催眠作用があるとともに、対症療法剤であるため根本的なアレルギー症状の改善には繋がらない。一方、ステロイド剤には低カリウム血症や浮腫など時として生命に関わるほどの重篤な副作用が存在するため、頓用としては有用であるものの長期連用は困難である場合が多く使用が制限されるのが現状である。したがって、増えつづける多様なアレルギー性疾患の予防や治療に対してこれら2種に代わる新規作用機序による副作用の少ない有効な医薬品を開発することは、患者のQOL改善の観点からも重要な課題といえる。

アレルギー反応は、マスト細胞上に発現するIgEレセプター(=FcεRI)に結合したIgEに、さらに抗原が結合することで放出されるケミカルメディエーターによって引き起こされる。最近、FcεRIのノックアウトマウスは正常に生存するが、アレルギー反応を起こさないことが報告されている。しかしながら、ケミカルメディエーター放出の引き金となるFcεRIのヒトマスト細胞上の発現抑制を標的とする抗アレルギー薬の開発研究は行われていない。このような背景のもと、申請者は、ヒト由来マスト細胞のFcεRI発現抑制物質探索のためのアッセイ系を構築し、薬用植物抽出エキスについてスクリーニングを行い、既に顕著に強い活性を示した日本茶から2種のカテキン類 epigallo-catechin gallate と epicatechin gallate を、生薬“葛花”より2種のイソフラボン類 tectorigenin と genistein を、これまで発見されていなかったヒトマスト細胞上FcεRI発現抑制活性物質として単離、同定している。

2. 研究の目的

本研究では、単離した化合物に基づいてより強力なIgEレセプター発現抑制作用を有する活性化合物の合成化学的探索を目的とするとともに、動物実験でも有効なIgEレセプター発現抑制を作用機序とする抗アレルギーリードの創製を目的とする。既に申請者は、エピカテキン類の構造活性相関より3位水酸基にガロイル基が結合した化合物がはるかに強い活性を示すことを見出している。しかし、このガロイル基は、生体内のエステラーゼにより容易に代謝を受けることが明らかにされており、生体内での活性発現を目的にエステル部分をより代謝を受けがたい構造へと変換した活性アナログを合成する。また、医薬品開発において芳香族化合物へのハロゲン原子導入が活性向上をもたらす例が多く報告されていることから、これまでに報告されている合成法を参考にハロゲン原

子を導入した活性アナログの合成化学的探索も行う。また、イソフラボン類については、市販で入手可能なイソフラボン類や天然活性化合物からの誘導体および葛花より単離する類縁体について構造活性相関の検討を行う。その結果をもとに、ハロゲン原子を導入した化合物や天然物からの誘導では合成不可能なイソフラボン類を合成し、より活性の増強された化合物を創製する。

一方、*in vivo*での抗アレルギー試験を目標として、まず、既に見出しているFcεRI発現抑制物質について実験動物(ラットを想定している)由来マスト細胞に対しても*in vitro*でFcεRI発現抑制活性を示すことを確認する。次の段階として、活性化合物を実験動物に投与した後、腹腔浸潤液よりマスト細胞を回収し細胞表面上のFcεRI発現量を評価することで、*in vivo*でもFcεRI発現抑制活性を示す候補化合物を選抜する。さらに、見出した候補化合物についてはPCA試験などの*in vivo*アレルギー試験を行い、抗アレルギー活性について評価する。これにより、FcεRI発現抑制が、実際に抗アレルギー作用に繋がることを明らかにできる。

3. 研究の方法

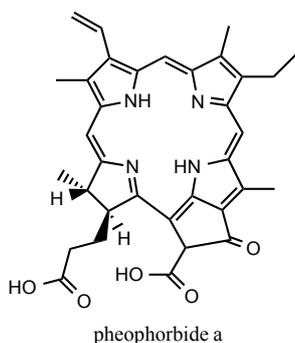
申請者が確立したヒトマスト細胞上IgEレセプター(=FcεRI)発現抑制の評価系によって、既に見出している活性天然物の化学構造を基に、代謝安定性や活性向上を目的として化学的修飾を加えた誘導体、類縁体を合成する。一方、これら化合物群を*in vivo*で有効な抗アレルギーリードへと昇格させるため、必要となる新たな評価系を構築する。まず、ラットを用いた動物実験へと展開する前段階として、ラット由来マスト細胞に対するFcεRI発現抑制活性の*in vitro*での評価系を構築する。次に、活性化合物をラットへ投与後に腹腔浸潤液よりマスト細胞を回収してFcεRI発現量を評価する系を確立する。さらに、*in vivo*でのFcεRI発現抑制を示した化合物は、代表的なアレルギー検査法であるPCA試験によって、抗アレルギー活性を評価する。

4. 研究成果

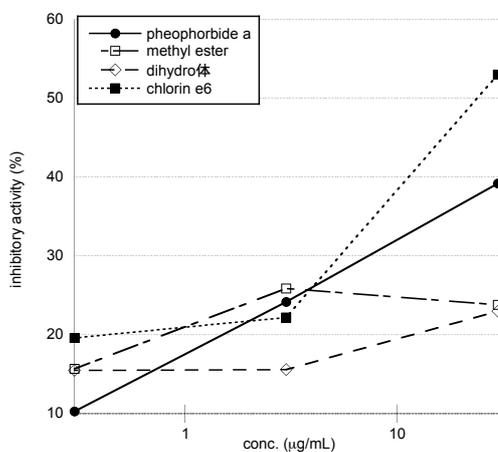
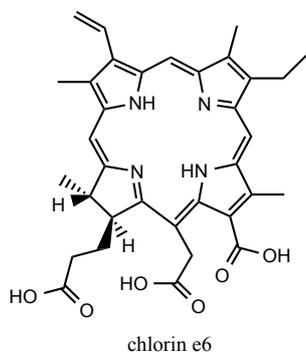
①ラットマスト細胞に対するIgEレセプター発現抑制

すでに構築していたヒトマスト細胞に対するIgEレセプター発現量評価系に倣い、ラット由来マスト細胞として一般的に用いられているRBL-2H3に対する評価系の構築を完了した。すなわち、抗Rat FcεRI抗体に続き二次抗体としてFITCラベル化抗体で処理してフローサイトメーターで蛍光強度を検出することでIgEレセプター発現量の測定が可能となった。しかしながら、ヒトマスト細胞に対するIgEレセプター発現抑制物質は、いずれもRBL-2H3に対しては活性を示さなかったため、これらの構造活性相関の検討を中断し、新たに天然資源由来のRBL-2H3に

に対する IgE レセプター発現抑制物質の探索を開始した。その結果、生薬ソヨウのメタノール抽出エキスより活性物質として「pheophorbide a」を見出した。



②活性物質「pheophorbide a」の構造活性相関
生薬ソヨウのメタノール抽出エキスから見出した活性物質「pheophorbide a」には、カルボキシル基やエキソオレフィン等の部分構造が存在していたことから、これらの官能基に有機化学的手法を加えてメチルエステル体、エキソオレフィン還元体を誘導した。しかしながら、これらの活性は pheophorbide a を上回るものではなかった。一方、市販品として入手可能な pheophorbide a の類似化合物である chlorin e6 は、pheophorbide a より強力な IgE レセプター発現抑制活性を示すことが明らかとなった。



③ラットより採取したマスト細胞の IgE レセプター発現量評価法

アレルギー症状と IgE レセプターの発現量の関係性については具体的な報告がほとんどなかったことから、IgE レセプターの発現抑制が抗アレルギー作用に繋がることを証明する必要があった。そこで、その前段階として、ラット腹腔浸潤液からマスト細胞を回収する方法を検討した。マスト細胞用バッファを腹腔内に注射し、開腹して細胞浸潤液を回収後、遠心分離によって細胞群を得たのち、Ficoll 液による密度勾配法によってマスト細胞を精製した。これらの細胞は、マスト

細胞が選択的に染色される toluidine blue によって精製を確認した。得られたマスト細胞については、固定化の後、in vitro での操作と同様に、抗 Rat FcεRI 抗体に続く FITC ラベル化抗体で処理してフローサイトメーターで検出することで IgE レセプター発現量の測定する方法を確立した。

④ラットを用いた chlorin e6 の in vivo IgE レセプター発現抑制活性の評価

量的確保が容易で強力な IgE レセプター発現抑制活性を示した chlorin e6 について in vivo での活性評価を進めた。まず、前項で説明したラット腹腔浸潤液より得られるマスト細胞に発現している IgE レセプター量を評価した。生薬ソヨウのメタノールエキスあるいは chlorin e6 を経口投与した場合に、IgE レセプター発現量が有意に減少していることが確認された。また、1 日の単回投与より、2 日連続で合計 2 回投与した方が抑制効果が大いことが判明し、さらに、用量依存的に抑制効果が現れることも確認した。これらの実験において、体重減少や下痢、脱毛等の毒性や副作用は認められなかった。

sample	dose	method	inhibition ratio (%)
MeOH ext. of Perilla Herb	500 mg/kg	a	19.5
		b	25.6
chlorin e6	10 mg/kg	b	46.5
	1 mg/kg	b	24.6

a : 1 day ad. b : 2 day ad.

⑤ラット PCA 反応を用いた chlorin e6 の抗アレルギー作用の評価

ラットに対して in vivo 経口投与でも IgE レセプター発現抑制効果が認められた chlorin e6 について、さらに、I 型アレルギーのモデルといわれている PCA 反応に対する抑制作用を検討した。本反応は IgE を皮内投与して感作させたのち、抗原と色素を静注することで感作させた箇所アレルギー反応を起こし、その結果として色素の浸潤が認められる反応である。IgE の皮内投与に 2 日先んじて chlorin e6 を経口投与し、抗原と色素の静注まで 4 日間連続で投与を続けて PCA 反応の結果を検証したところ、chlorin e6 10 mg/kg の投与量で約 40% の色素浸潤抑制が認められた。この結果によって、IgE レセプターの発現抑制が抗アレルギーに繋がることを示すと共に、chlorin e6 がラットに対して抗アレルギー作用を持つことが示された。

sample	dose	inhibition ratio (%)
chlorin e6	10 mg/kg	40.2%
	5 mg/kg	29.4%

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 Kotoku, N.; Mizushima, K.; Tamura, S.; Kobayashi, M. Synthetic Studies of Cortistatin A Analogue from the CD-Ring Fragment of Vitamin D2. *Chem. Pharm. Bull.* **61**, 1024-1029 (2013). 査読有.

DOI: dx.doi.org/10.1248/cpb.c13-00375

② Ozawa, M.; Morita, M.; Hirai, G.; Tamura, S.; Kawai, M.; Tsuchiya, A.; Oonuma, K.; Maruoka, K.; Sodeoka, M. Contribution of cage-shaped structure of physalins to their mode of action in inhibition of NF- κ B activation. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 730-735 (2013). 査読有.

DOI: dx.doi.org/10.1021/ml400144e

③ Tamura, S.; Inomata, S.; Ebine, M.; Genji, T.; Iwakura, I.; Mukai, M.; Shoji, M.; Sugai, T.; Ueda, M. Triazolyl-phenyl linker system enhancing the aqueous solubility of a molecular probe and its affinity labeling of a target protein for jasmonate glucoside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 188-193 (2013). 査読有.

DOI: dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.124.

④ Kotoku, N.; Sumii, Y.; Hayashi, T.; Tamura, S.; Kawachi, T.; Shiomura, S.; Arai, M.; Kobayashi, M. Creation of readily accessible and orally active analogue of cortistatin A. *ACS Med. Chem. Lett.* **3** (8), 673-677 (2012). 査読有.

DOI: dx.doi.org/10.1021/ml300143d.

⑤ Ueda, M.; Yang, G.; Ishimaru, Y.; Itabashi, T.; Tamura, S.; Kiyota, H.; Kuwahara, S.; Inomata, S.; Shoji, M.; Sugai, T. Hybrid stereoisomers of a compact molecular probe based on a jasmonic acid glucoside: Syntheses and biological evaluations. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5832-5843 (2012). 査読有.

DOI: dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.003.

[学会発表] (計 5 件)

田村 理、天然物からメディシナルケミストリーとケミカルバイオロジー、第 48 回天然物化学談話会、2013/7/3、大津市

[図書] (計 1 件)

田村 理、化学工業社、化学工業、2014 発行、15-21 ページ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 理 (TAMURA, Satoru)

東北大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号 : 30362619