

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460132

研究課題名(和文) 制御性T細胞への分化誘導を促進する天然化合物の探索と機能解析

研究課題名(英文) The search and functional analysis of the natural compound promoting the differentiation of regulatory T cells.

研究代表者

小谷 仁司 (KOTANI, Hitoshi)

武蔵野大学・薬学研究所・助教

研究者番号：10594640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、創薬を目指して自己免疫疾患や、慢性炎症を生じる疾患における過剰な免疫を抑制する制御性T細胞の分化を調節する天然化合物の探索を行った。その結果、沈香という生薬に含まれる成分に制御性T細胞の分化を抑制することを見出した。制御性T細胞の分化を抑制することで、この天然化合物は免疫を賦活化することができ、抗腫瘍活性などが期待される。

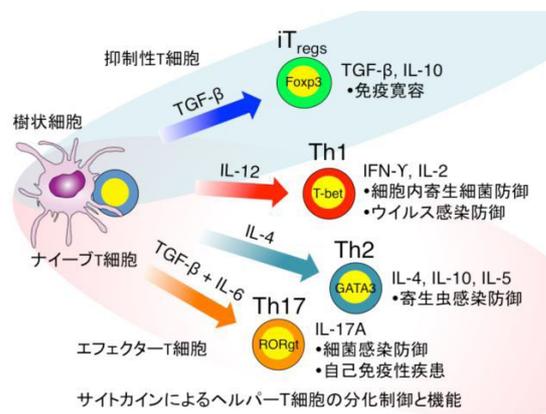
研究成果の概要(英文)：In this study, I searched for the natural compound which regulated the differentiation of the regulatory T cell which controlled excessive immunity. As a result, I found that the ingredient included in the crude drug called JINKO inhibited the differentiation of the regulatory T cells from Naive T cells. This natural compound can activate immunity by restraining the differentiation of the regulatory T cells, and anti-tumor activity is expected.

研究分野：天然物化学

キーワード：制御性T細胞 免疫賦活 生薬 天然物 沈香 癌 インターフェロンガンマ 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

ナイーブT細胞は、サイトカインの刺激に応じてTh1, Th2, Th17といったエフェクターT細胞と呼ばれるヘルパーT細胞へと分化することが知られている。これらのヘルパーT細胞は通常、様々な感染防御に重要な存在であるが、過剰な免疫反応により自己免疫疾患やその他の慢性炎症疾患が起きるとされている。これらの過剰な免疫反応を抑制する因子として制御性T細胞が存在する。リウマチ、アトピー性皮膚炎、花粉症などの免疫アレルギー疾患は免疫過剰状態、あるいは免疫寛容の破綻した状態である。また逆に、癌組織においては、免疫応答に反応しなくなる免疫不応答の状態である。このような状態には、制御性T細胞の分化を調節することにより改善することが期待される。



### 2. 研究の目的

本研究は創薬を目指して、自己免疫疾患や慢性炎症を生じる疾患（肥満・糖尿病、動脈硬化症など）における炎症性T細胞（Th1やTh17）に対する抑性能を持つ制御性T細胞の分化を促進または抑制する天然由来化合物の探索とその機能解析を目的としている。本研究により、新規の薬剤開発がすすむことや、制御性T細胞への分化を制御する新たなメカニズムの発見が期待される。

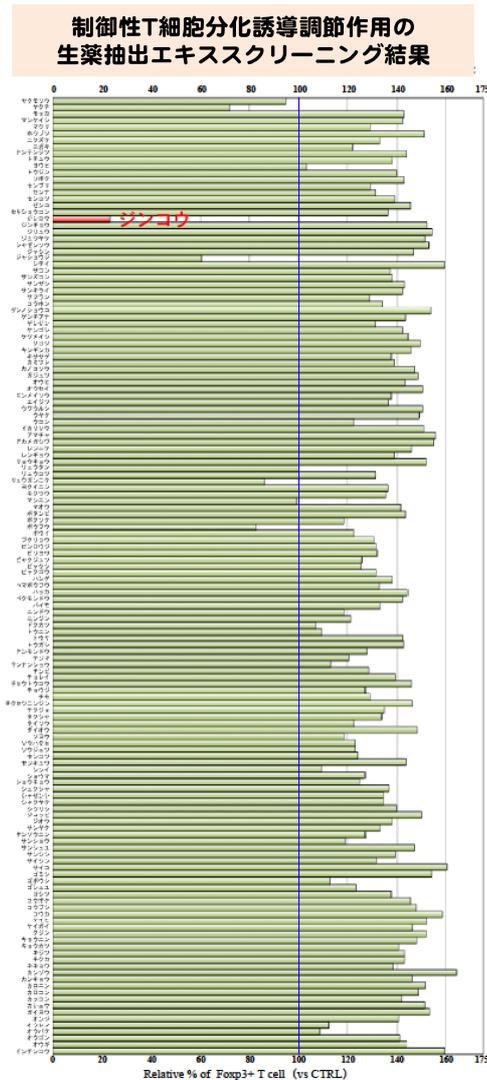
### 3. 研究の方法

古くから多くの慢性疾患に対して使われ、生理活性物質を多く含む生薬を創薬資源として、制御性T細胞分化誘導の新たな作用機序を持つ天然由来化合物を探索することとした。生薬よりメタノールを用いて抽出エキスを作製し、マウスから採取したNaive T細胞に対して制御性T細胞への分化を誘導するサイトカインなどと一緒には生薬エキスを添加することにより、分化に対する影響を調べた。分化の検出は抗体染色によるフローサイトメーター解析を行った。また、活性の有する生薬エキスに関しては、有機化学的手法を用いて活性成分の分離精製をおこなった。

### 4. 研究成果

#### 制御性T細胞への分化を調節する生薬抽出エキスのスクリーニング

ナイーブT細胞をiTreg条件で3日間培養し、生薬抽出エキスを添加することによるFoxp3発現の割合変化の解析をフローサイトメーターにより行った。その結果、制御性T細胞への分化誘導を大きく抑制する生薬抽出エキスとして、ジンコウが見出された。

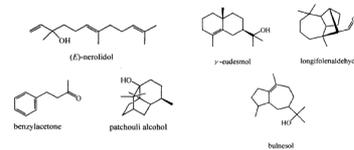


#### ジンコウ(沈香、伽羅)



基原：Aquillaria agallocha Roxb. (ジンチョウゲ科)  
産地：ベトナム、カンボジア、インドネシア、タイ、ラオス、ミャンマーなど  
成分：精油成分を多く含む。セスキテルペンなど  
応用：薬香料、鎮静、鎮痛、抗菌など

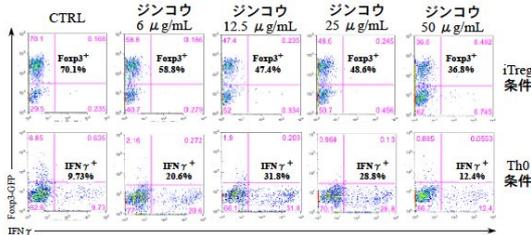
#### 沈香オイルに含まれる成分の構造



引用：生薬学雑誌 63 (2),39-45 (2009)

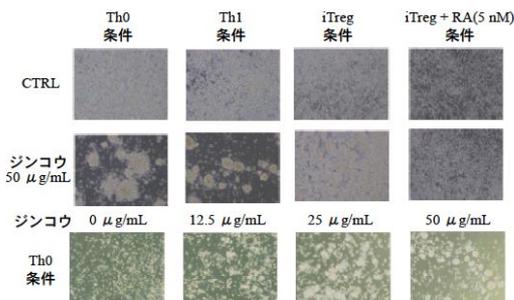
## In vitro でのヘルパーT細胞分化に対するジンコウ抽出エキスの効果

ナイーブT細胞を iTreg 条件または Th0 条件で3日間培養し、ジンコウ抽出エキスを添加することによる Foxp3 発現と IFN 発現の割合変化の解析をフローサイトメーターにより行った。その結果、ジンコウ抽出エキスを添加することにより、濃度依存的に iTreg への分化抑制する結果が得られた。また、Th0 条件時にジンコウ抽出エキスを添加することにより IFN の産生を濃度依存的に促進する結果が得られた。



## ヘルパーT細胞の分化時における形態変化の観察

と同様にナイーブT細胞を Th0 条件、Th1 条件、iTreg 条件、iTreg 条件+レチノイン酸の4つの条件でジンコウ抽出液を添加することによる形態変化を観察した。その結果、ジンコウ抽出エキスの濃度依存的なT細胞のクラスタリングが見られたが、レチノイン酸を添加することでクラスタリングが緩和された。



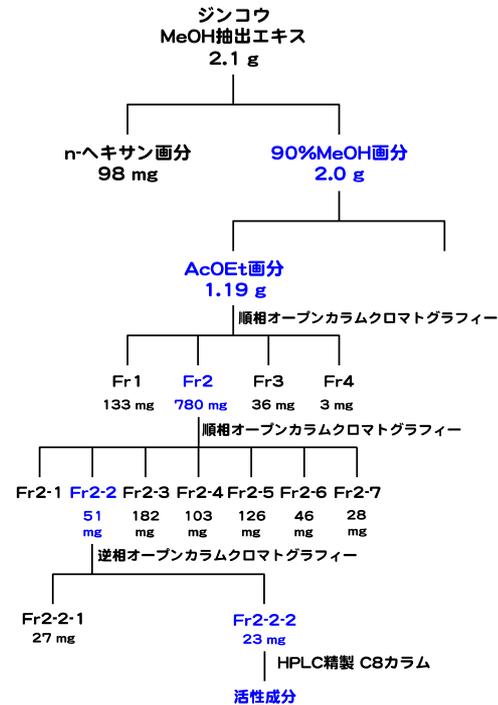
各種ヘルパーT細胞の分化誘導条件

Th0 条件	Th1 条件	iTreg 条件	iTreg + RA 条件
(plate coated)	(plate coated)	(plate coated)	(plate coated)
anti-CD3: 4 $\mu$ g/mL	anti-CD3: 4 $\mu$ g/mL	anti-CD3	anti-CD3
(soluble)	(soluble)	(soluble)	(soluble)
anti-CD28: 2 $\mu$ g/mL	anti-CD28: 2 $\mu$ g/mL	anti-CD28	anti-CD28
	IL-12: 10 ng/mL	TGF $\beta$ : 2 ng/mL	TGF $\beta$ : 2 ng/mL
			RA: 5 nM

## 制御性T細胞分化誘導抑制物質の探索

ジンコウ MeOH 抽出エキスより制御性T細胞への分化誘導抑制作用を指標に、活性成分の分離精製を各種クロマトグラフィーによりおこない、単離精製した。

## ジンコウからの免疫賦活成分精製



本研究により、スクリーニングの結果、多くの生薬エキスで制御性T細胞経の分化誘導された細胞の割合が CTRL の 1.5 倍以上を示した。また、制御性T細胞の分化抑制能を有する生薬エキスとして沈香を見出した。また、その活性成分の分離精製を行うとともに、分化抑制のメカニズムとしてT細胞のクラスタリングの促進および、IFN の産生を見出した。

## 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 4 件)

Inoue M, Tanabe H, Nakashima K, Ishida Y, Kotani H.

Rexinoids isolated from *Sophora tonkinensis* with a gene expression profile distinct from the synthetic rexinoid bexarotene.

J Nat Prod. 25;77(7)1670-7.2014

DOI:10.1021/np5002016.

Tanabe H, Yasui T, Kotani H, Nagatsu A, Makishima M, Amagaya S, Inoue M.

Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes.

Bioorg Med Chem. 15;22(12)3204-12.2014

DOI:10.1016/j.bmc.2014.03.047.

Yoshida H, Kotani H, Kondo T, Tani I, Wei X, Tsuruta S, Kimura A, Asakawa M, Ito M, Nagai S, Yoshimura A  
CDK inhibitors suppress Th17 and promote iTreg differentiation, and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in mice.  
BioChem Biophys Res Commun.7;435(3)378-84.2013  
DOI:10.1016/j.bbrc.2013.04.096.

Go Muto, Hiotshi Kotani, Taisuke Kondo, Rimpei Morita, Sanae Tsuruta, Takashi Kobayashi, Herve Luche Hans Joerg Fehling, Matthew Walsh, Yongwon Choi, Akihiko Yoshimura.  
TRAF6 is essential for maintenance of regulatory T cells that suppress Th2 type autoimmunity.  
PLoS One.13;8(9)e74639.2103  
DOI:10.1371/journal.pone.0074639.

片川 和明 (KATAKAWA, Kazuaki)  
武蔵野大学薬学部・講師  
研究者番号：90433606

〔学会発表〕(計 1件)

小谷仁司、中川竜介、吉村昭彦、渡辺恵史  
制御性 T 細胞の分化誘導を調節する生薬エキスのスクリーニング  
日本生薬学会第 61 回年会 (2014 年 9 月 23 日 福岡大学 福岡)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小谷 仁司 (KOTANI, Hitoshi)  
武蔵野大学薬学部・助教  
研究者番号：10594640

### (2)研究分担者

なし

### (3)研究協力者

井上 誠 (INOUE, Makoto)  
愛知学院大学薬学部・教授  
研究者番号：50191888

吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko)  
慶應義塾大学医学部・教授  
研究者番号：90182815

田邊 宏樹 (TANABE, Hiroki)  
北陸大学薬学部・准教授  
研究者番号：10415606