

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82610
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25670233
研究課題名(和文)アルカロイド化合物：ハルミンによる免疫制御機構の解明および免疫疾患への治療応用

研究課題名(英文)Harmine regulates immune responses

研究代表者
木村 彰宏(Kimura, Akihiro)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：20533318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハルミンが標的因子Xを介してLPS誘導性のIL-6産生を抑制していることを明らかにした。またハルミンがLPSによるエンドトキシンショックを抑制するはたらきがあることを発見した。

ハルミンはTreg細胞分化を促進するはたらきがあることを示していたが、この促進効果においてもハルミンの標的因子Xを介して行なわれていることを解明した。一方でハルミンはTh17細胞の分化を抑制する作用を有しているが、Th17細胞分化抑制においても標的因子Xを介していた。以上のことから免疫応答におけるハルミンの薬理作用は標的因子を介していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Harmine suppresses LPS-induced IL-6 production. Target X for harmine is required for the inhibition by harmine on IL-6 production. Furthermore, we found that harmine suppresses LPS-induced endotoxin shock.

While Harmine enhances the development of Treg cells, it inhibits Th17 cell differentiation. We demonstrated that Target X for harmine is required for enhancement of Treg cells and suppression of Th17 cells. These results indicate that harmine regulates the immune responses via the Target X for harmine.

研究分野：免疫

キーワード：ハルミン LPS Th17 Treg

1. 研究開始当初の背景

天然から抽出される低分子化合物には生体においてさまざまな薬理活性を有するものが発見されている。免疫応答を制御する天然物化合物やその標的因子を同定し、天然物化合物が有する免疫系における薬理活性を解明していくことは、さまざまな自己免疫疾患や炎症疾患に対する新規治療法の開発に繋がることが期待される。現在、本申請者はオーファンリガンドライブラリーの中からさまざまな免疫応答を制御する天然アルカロイド化合物(ハルミン)を同定している。さらにマクロファージにおいてハルミンの新規標的因子の同定を完了している。本研究では**免疫応答制御機構や自己免疫疾患におけるハルミンとその標的因子の作用機序を解明していくとともに、自己免疫疾患に対するハルミンによる新規治療法の開発を目指す。**

2. 研究の目的

近年、低分子化合物を活用したケミカルジェネティクスはさまざまな生命現象の解明に大きく貢献してきた。それは免疫の分野においても例外ではなく、特異的な免疫抑制作用を示す低分子化合物も発見、開発されており医薬品としてさまざまな疾患の治療に役立てられている。天然化合物による治療へと発展させる際に、副作用の問題なども生じてくることから、天然物リガンドによる免疫制御機構を正確に解明しなければならない。そのために、**免疫応答制御および自己免疫疾患を抑制する新規天然物リガンドの発見、天然物リガンドの標的因子の同定、同定された標的因子を中核とした新規天然物リガンドによる免疫応答制御の解明、さまざまな自己免疫疾患に対する治療応用、**これらを包括的に研究していく必要がある。

本研究では、東京工業大学の半田宏教授との共同研究により、上記①～④に関して包括的に研究を進展させていく。最近、本

申請者らはオーファンリガンドライブラリーの中からさまざまな免疫応答を非常に強く抑制する天然アルカロイド化合物(ハルミン)を同定した。各免疫担当細胞におけるハルミンの解析も進めており、マクロファージにおいてハルミンがLPS誘導性の炎症性サイトカイン産生などの自然免疫応答を強く抑制していることを発見した。また東京工業大学の半田宏教授教授との共同研究においてマクロファージにおけるハルミンの標的因子(特許申請中のため標的因子Xとする)を同定している。ハルミンはマクロファージのみならず、自己免疫疾患に関与しているIL-17産生性ヘルパーT細胞(Th17)の分化も抑制しており、マウスモデルにおいてExperimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)などの自己免疫疾患を抑制する効果があることも確認している。

本研究においては以下に示すことを明らかにしていく。1.マクロファージにおいて同定されたハルミンの標的因子Xによる自然免疫応答の制御機構を解明する。2. T細胞におけるハルミンの標的因子をマクロファージの時と同様に同定する。同定された標的因子がT細胞の分化、特にTh17細胞の分化をどのように制御しているのかを明らかにする。3.関節リウマチや腸炎などの自己免疫疾患や炎症性疾患におけるハルミンの抑制効果を検証する。4. EAEにおいてハルミンがどの免疫担当細胞を標的にすることで抑制効果を示しているのかを明らかにする。本研究は最先端のピーズテクノロジーを中核としたケミカルバイオロジーと免疫学との融合により、新たな免疫応答制御機構の発見および自己免疫疾患に対して天然低分子化合物を用いた新規治療法の開発を目指している点に独創性がある。

本研究計画の完遂により、これまでの疫学的な手法では発見されていなかった新

規免疫システムの発見が期待される。また、自己免疫疾患の治療において生物学的製剤と同等あるいはそれ以上の効果を示し、安全性の確認された天然物リガンドの発見は、生物学的製剤よりも安価で有効な治療方法へと繋がる点において本研究は非常に意義深いものである。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおけるハルミンと標的因子 X による自然免疫応答の制御機構

本申請者らはこれまでにマクロファージにおいてハルミンが LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生などの自然免疫応答を強く抑制していることを発見している。また東京工業大学の半田宏教授との共同研究においてマクロファージにおけるハルミンの標的因子 X を同定している。さらに本申請者は RAW 細胞に標的因子 X を安定発現させた細胞株を樹立しており、安定発現させた細胞株ではコントロール群に比べ、ハルミンによる LPS 誘導性 IL-6 産生の抑制がより強くなることを確認している。現在、標的因子 X の KO マウスを海外の研究機関より分与してもらい解析を進めている。この KO マウスからマクロファージを単離し、コントロールの wild type(WT)マウス由来のマクロファージと共に LPS または LPS+ハルミンで刺激後 IL-6 産生を ELISA 法にて測定することで、マクロファージにおけるハルミンの IL-6 抑制作用が標的因子 X を介していることを証明する。

生体内において LPS はエンドトキシンショックを誘導し致死をもたらすことも知られている。ハルミンは LPS 誘導性の炎症性サイトカインを抑制することから、LPS 誘導性のエンドトキシンショックによる致死をハルミンにより回避することが出来るか検証する。致死量の LPS をマウスに投与し、ハルミンを投与したマウスとコントロール

群の生存率を比較する。また標的因子 X KO マウスにおいても同様に実験を行い、in vivo におけるハルミンの作用機構に関して標的因子 X を介していることを明らかにする。

(2) T 細胞分化におけるハルミンの作用機序の解明

本申請者らはハルミンが Th17 細胞の分化も抑制していることを発見していることから、次に T 細胞におけるハルミンの標的因子を決定する。東京工業大学の半田宏教授は半田ビーズを独自に開発し、これまでに化合物などのさまざまな標的因子を同定してきた(*Science* 327,1345-1350, 2010)。マクロファージと同様に半田宏教授との共同研究のもと、半田ビーズを用いて Th17 細胞分化におけるハルミンの標的因子を同定する。その際、医薬基盤研究所の仲哲治プロジェクトリーダーとの共同研究により、質量分析による標的因子の同定を進める。さらに、T 細胞において同定されたハルミンの標的因子の KO マウスを入手あるいは作製し、ハルミンによる Th17 細胞の分化抑制を解析することで、T 細胞におけるハルミンの標的因子とハルミンの関連性を解明していく。

4. 研究成果

本年度は T 細胞におけるハルミンの作用機序を解明した。Th17 細胞分化時においてハルミンが Stat3 の活性化を抑制していることが明らかになった。このことによりハルミンは Th17 細胞分化を抑制しているものと考えられる。一方でハルミンは Th17 細胞および Treg 細胞分化時における Smad2 の活性化には影響しないことも明らかになった。以上の結果からハルミンは TGF- β のシグナルを直接的には抑制していないことが示された。今後はハルミンがどのように IL-6 のシ

グナルを抑制しているのかを解明していく必要がある。

昨年度にマクロファージにおいてハルミンは標的因子Xを介してIL-6などの炎症性サイトカインを抑制していることを明らかにした。T細胞においてもハルミンがこの標的因子Xを介して作用しているのかを解析した。標的因子X欠損T細胞を用いてTreg細胞分化におけるハルミンの効果を調べたところ野生型T細胞ではTGF- β によるTreg細胞分化はハルミン添加により促進されていたが、標的因子X欠損T細胞ではハルミンによる分化促進作用がキャンセルされていた。

またTh17細胞分化においても同様に調べた所、野生型T細胞ではハルミンによりTh17細胞分化が抑制されていたが、標的因子X欠損T細胞ではハルミンによる分化抑制効果がキャンセルされていた。以上のことからマクロファージと同様にT細胞においてもハルミンは標的因子Xを介して薬理作用を示していることが明らかになった。

ハルミンの標的因子Xをマクロファージ(RAW細胞)に安定発現させ(RAW/X)、コントロール細胞(RAW/Neo)とともにLPSまたはLPS+ハルミンで刺激し、IL-6の産生を比較した。その結果、LPS+ハルミンの刺激においてRAW/X細胞ではハルミンによるIL-6産生抑制がコントロール細胞よりも有意に強いことが明らかになった。このことからハルミンによる炎症性サイトカインの産生抑制効果は標的因子Xを介していることが示された。一方で、ハルミンはLPSにより誘導される抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生を促進する。このハルミンによるIL-10産生促進に関しても標的因子Xを介して行われていることが判明した。また非常に興味深いことに、RAW/NeoおよびRAW/XをLPS単独で刺激するとIL-6の産生RAW/Xにおいて有意に抑制されていることが明らかになった。この結果は標的因子Xが炎症応

答を抑制するはたらきがあることを示唆している。

次にLPS投与によるエンドトキシンショックに対するハルミンの効果を調べた。LPSとハルミンを同時に投与したマウスではLPS単独投与のマウスに比べて生存率が有意に改善することが示された。ハルミンの類似体であるハルマリンやハルマンなどの投与においても生存率が改善したことからハルミンなどのアルカロイド系化合物は免疫応答を抑制する作用があることが明らかとなった。

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)

1. Chinen I, Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Takemori H, Kumagai A, Kayama H, Takeda K, Lee S, Hanieh H, Ripley B, Millrine D, Dubey PK, Nyati KK, Fujii-Kuriyama Y, Chowdhury K, Kishimoto T. The aryl hydrocarbon receptor/microRNA-212/132 axis in T cells regulates IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Int immunol* 2015. pii: dxv015. [Epub ahead of print] (査読有り)
2. Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 160-165, 2015. doi: 10.1073/pnas.1413234112. (査読有り)
3. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, Morita R, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int immunol* 26: 209-220, 2014. doi: 10.1093/intimm/dxt067.

(査読有り)

4. Abe H, Kimura A, Tsuruta S, Fukaya T, Sakaguchi R, Morita R, Sekiya T, Shichita T, Chayama K, Fujii-Kuriyama Y, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles in ConA-induced hepatic injury by both suppressing IFN- γ expression and inducing IL-22. *Int immunol* 26: 129-137, 2014. doi: 10.1093/intimm/dxt049. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

Kimura Akihiro, Yoshimura Akihiko. Aryl hydrocarbon receptor controls autoimmunity through regulating the development of regulatory B cells. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013, Makuhari Messe, December 12, 2013 (口頭・査読有)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

木村 彰宏 (KIMURA AKIHIRO)

国立国際医療研究センター・免疫病理部

門・室長

研究者番号 : 20533318