

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：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670057

研究課題名(和文) 抗IL-33薬の創薬、それによるアレルギーの初期予防への応用

研究課題名(英文) Development of anti-IL-33 agent and application for prevention of early allergic disease

研究代表者

庄司 省三 (Shoji, Shozo)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・名誉教授

研究者番号：60040317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アレルギー反応誘導に關与するIL-33の活性を阻害する化合物の探索を行った。ヒト好塩基球由来細胞であるKU812細胞を利用したin vitro評価系を構築し、その探索を行った。IL-33とその受容体であるST2L複合体の構造解析の結果を参照し、化合物を選択またはデザインし新規に化学合成した。その結果、Fi-10とF-11と名付けられた新規化合物が検討した化合物の中で最も高い抗IL-33活性を示した。これらの化合物はIL-33に作用してIL-33活性を阻害している可能性が考えられた。本研究で得られた知見を基に、構造を最適化し更に活性の高い抗IL-33化合物の開発が求められる。

研究成果の概要(英文)：IL-33, a member of IL-1 family, is deeply associated with allergic reactions. In this study, we explored the anti-IL-33 agents. We established an in vitro assay system using KU812 cells that are known as immature human basophilic cell line to investigate the anti-IL-33 agents. Reported crystallographic structure of complex of IL-33 and the receptor ST2L was referred to select already known compounds or to synthesized novel compounds for the evaluation. As a result, two novel compounds, named Fi-10 and Fi-11, interestingly showed highest anti-IL-33 activity in the examined compounds in this study. It was suggested that the two compounds directly act to IL-33 to inhibit the activity. Further optimization of the chemical structure based on our results should be required to develop highly specific anti-IL-33 agents in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IL-33

1. 研究開始当初の背景

ステロイド抵抗性の即時型アレルギー反応において、抗原暴露からアレルギー反応が誘導されるまでの過程を十分に説明することが出来ていなかった。

近年 IL-33 が直接マスト細胞に結合し、即刻ヒスタミンを遊離させる経路の報告がなされ、その機構の全容が明らかにされつつ有る。そのような背景のもと IL-33 阻害剤の創製に血眼がそそがれているが、現在抗 IL-33 薬は開発に至っていない。

2. 研究の目的

現状を鑑み、抗 IL-33 薬を創製し、それによる花粉症、喘息、アトピー、食物アレルギーの発症初期予防に役立てることを勘案し、研究を遂行することを目的としている。

3. 研究の方法

ヒト好塩基球細胞 KU812 細胞は 10%FCS を含む RPMI で培養された。Recombinant human IL-33 を KU812 細胞に処理し、培養後、培養上清中の IL-5 濃度を ELISA により定量した。各種化合物の KU812 細胞に対する細胞毒性は WST-8 を主成分とする Cell counting kit-8 またはトリパンブルー染色法により評価した。

4. 研究成果

ヒト好塩基球細胞を利用した in vitro IL-33 応答評価系の構築

IL-33 は R&D systems の recombinant human IL-33 を用いた。ヒト好塩基球細胞株 KU812 細胞を 1×10^6 cells/ml (1 mL, 24 well plate) の条件下で IL-33 を最終濃度が 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml となるよう処理し、24 h 後に培養上清を回収した。また、100 ng/ml の IL-33 処理後 0 h, 14 h, 及び 24 h にお

ける培養上清を回収した。培養上清中の IL-5 レベルを ELISA により定量した。ELISA は R&D systems の Quanikine® ELISA human IL-5 を使用した。その結果、IL-33 の処理濃度依存的に培養上清中の IL-5 レベルが高くなり、100 ng/ml の IL-33 を処理することとした。また 100 ng/mL の IL-33 を処理で時間依存的に培養上清中の IL-5 レベルが高くなり、IL-33 処理 24 h 後の IL-5 レベルを評価することとした。

IL-33 は IL-33 受容体である ST2L に結合すると、IL-1 receptor accessory protein (IL-1 RAcP) がリクルートされ細胞内シグナル伝達を誘導する。KU812 細胞に IL-33 刺激による IL-5 の産生が、IL-33 受容体を介した応答であることを確認するために、ST2L の細胞外ドメインを免疫抗原として作製されたポリクローナル抗体処理 (10 µg/ml) が、IL-33 応答による IL-5 産生に与える影響を検討した。その結果、IL-33 応答による IL-5 の産生レベルが抗体処理により 40%程度まで低下した。この結果から、KU812 細胞に対する IL-33 処理による IL-5 の産生が、IL-33 と IL-33 受容体を介した応答であることが確認された。

選択された各種化合物の抗 IL-33 活性の評価

検討 I

はじめに、アミノ酸誘導体である TGS1-0、TGS1-1、TGS1-2、TGS1-3、及び TGS1-4 について抗 IL-33 活性を評価した。TGS1 化合物は、報告されている IL-33 と ST2L の複合体の構造解析の結果 (PNAS 2013) を基にして選択された既存の分子量約 150 から 300 の化合物である。TGS1 化合物を濃度は 0.1 mM および 1 mM で検討した。まず各 TGS1 化合物の KU812 細胞に対する細胞毒性を検討した。細胞毒性は同仁化学研究所の Cell counting kit-8 を用

いた。これは生細胞内において、テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として水溶性ホルマザンを生成する原理を利用したものであり、発色度をマイクロプレートリーダーにより 630 nm を参照波長とし 450 nm の吸光度を測定することで生細胞数を評価した。その結果、0.1 mM および 1 mM の濃度において細胞毒性は認められなかった。次に、TGS1-0~TGS1-4 の抗 IL-33 活性を評価した。化合物処理濃度は 0.1 mM および 1 mM とした。その結果、IL-33 処理による IL-5 産生応答に各種化合物の影響は認められなかった。これら化合物には抗 IL-33 は無いと結論づけた。

検討 II

検討 II として、糖脂質構造、脂質様構造、ペプチド様構造、脂質修飾化合物導体等の分子量約 200~1000 となる新規化合物を含む Fi-1、Fi-2、Fi-3、Fi-4、Fi-5、Fi-6、Fi-7、及び Fi-8 化合物について検討した。これらの化合物についても検討 I と同様に IL-33 と ST2L の複合体の構造解析の結果を基にして選択もしくは新規に化学合成された化合物である。KU812 細胞に対する毒性および培養上清中の IL-5 レベルを指標として抗 IL-33 活性を評価した。濃度は 0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 及び 1000 μ M で評価した。

Fi-1 において、100 μ M および 1000 μ M において細胞毒性が認められ、1000 μ M ではほとんどの細胞が死滅し、100 μ M でも 90%以上の細胞が死滅した。IL-5 レベルは 1000 μ M では毒性のため検出感度以下であったが、興味深いことに 100 μ M においてはコントロールレベルと同等の IL-5 レベルであった。

Fi-2 において、1000 μ M でほとんどの細胞が死滅した。100 μ M で細胞生存率が約 50%程度であった。このとき、1000 μ M では IL-5 レベルは検出感度以下であった。一方、興味深いことに 100 μ M ではコントロールの 2 倍程度の IL-5 レベルであった。10 μ M 以下の

Fi-2 濃度では IL-5 レベルはコントロールと同等であった。

Fi-3 において、1000 μ M の濃度においても細胞毒性は認められられず、IL-5 レベルにおいてもコントロールと同等レベルであった。

Fi-4 において、1000 μ M の濃度において細胞毒性は認められなかった。興味深いことに、IL-5 レベルはコントロールの 2 倍程度のレベルであった。

Fi-5、Fi-6、及び Fi-7 は共通骨格の化合物にアルキル鎖の長さが異なる構造が付加された化合物となる。Fi-5 と Fi-6 について、1000 μ M の濃度で細胞毒性が認められず、また IL-5 レベルにおいてコントロールと比較して差は認められなかった。Fi-7 において、1000 μ M の濃度において細胞毒性は認められなかった。興味深いことに、1000 μ M の濃度で IL-5 レベルがコントロールと比較して有意に低かった。

Fi-8 においては 1000 μ M および 100 μ M の濃度で、全ての細胞が死滅した。10 μ M の濃度では細胞生存率が 80%程度であった。IL-5 レベルは 1000 μ M および 100 μ M では検出感度以下であった。興味深いことに 10 μ M の濃度において IL-5 レベルがコントロールの約 10%程度の低いレベルであった。

検討 II において、Fi-2 および Fi-4 において細胞毒性が認められない濃度において、IL-5 レベルの有意な上昇が認められた。期待とは逆の結果であったが、これらの化合物が IL-33 や IL-33 受容体に作用し、IL-33 の応答を亢進した可能性、もしくは全く異なるメカニズムで IL-33 応答を亢進した可能性が考えられる。

Fi-5、Fi-6、Fi-7 は共通構造も有するが、アルキル鎖の長さが異なる化合物であるが、Fi-7 において毒性を示さない 1000 μ M の濃度で IL-33 応答を抑制している。このことに着目し、さらにアルキル鎖の長さの異なる化合物 Fi-9、Fi-10、Fi-11 を合成し、抗 IL-33

活性を評価することとした。

検討 III

Fi-9 において、1000 μM で細胞毒性を示さず、また 1000 μM で IL-5 レベルはコントロールとほとんど差は認められなかった。Fi-10 において、細胞毒性を検討した結果、Fi-10 では細胞生存率が 10%であり、100 μM ではコントロールと同等の生存率で毒性はなかった。このとき IL-5 レベルは 1000 μM では検出感度以下であり、100 μM ではコントロールの 60%程度の IL-5 レベルであった。Fi-11 において、1000 μM で細胞はほとんど死滅したが、100 μM ではコントロールと同等の細胞生存率であった。このとき IL-5 レベルは 1000 μM では検出感度以下、100 μM でコントロールの約 30%のレベルであった。以上の結果から、Fi-10 と Fi-11 は IL-33 の応答を抑制していることから、抗 IL-33 活性を持つ可能性が考えられた。

Fi-10 と Fi-11 の IL-33 への直接的な作用の可能性を検証するため、IL-33 に対して 1000 μM または 100 μM で前処理し、KU812 細胞に前処理 IL-33 を投与した。KU812 細胞処理時お化合物濃度は 1/10 になっている。その結果、細胞毒性は認められず、また IL-5 レベルは Fi-11 において著しく低いレベルであり、Fi-10 においてはコントロールの 30%程度のレベルであった。また、Fi-6, Fi-9, Fi-6 についても同様に IL-33 へ前処理し細胞に投与したところ、IL-5 レベルにはコントロールと比較して有意な変化は認められなかった。以上の結果から、Fi-10 と Fi-11 の示す抗 IL-33 活性は IL-33 に対する直接的な作用の可能性が示唆された。

まとめ

IL-33 と ST2L の複合体の構造解析の結果 (PNAS 2013) を基にして選択、新規に化学合成された一連の化合物の抗 IL-33 活性を評価

した結果、Fi-10 および Fi-11 の化合物において濃度が高いながらも特異的な抗 IL-33 活性を示すことが明らかとなった。類似の化合物では抗 IL-33 活性を示していないことから、今回の研究で得られた構造活性相関を基にして更に化合物の合成展開をし、細胞毒性が無く特異性が高い抗 IL-33 化合物の探索を継続していくことが重要である。本研究結果が今後、ステロイド抵抗性の即時型アレルギーに対する創薬につながることを期待する。

5 . 主な発表論文等

なし

〔その他〕

連携先のホームページの URL

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/emhs/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

庄司省三 (SHOJI, Shozo)

熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬)・
名誉教授

研究者番号 : 60040317