

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K15497
研究課題名(和文) 伝承薬セージ中の新規AhRリガンドを用いたT細胞サブセットへの分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Induction mechanism into T cell differentiation by AhR ligand from sage

研究代表者
西野 勝俊(Nishino, Katsutoshi)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60803492
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシン受容体として知られる芳香族炭化水素受容体(AhR)は、その活性化が、免疫細胞であるヘルパーT細胞のサブセットである、免疫促進のTh17細胞とTh22細胞、および制御性T細胞(Treg)の3つの細胞への分化促進に関わっていることが明らかとなっている。申請者は、ハーブの1種であるセージから、これまでAhRリガンドとしての報告がない、アビエタン型ジテルペンを7種同定した。さらにそれらが、Th17細胞およびTreg細胞分化を促進、もしくは抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ダイオキシンの受容体とも考えられている炭化水素受容体(AhR)は、近年、様々な生理機能に関わっていることが報告されている。この受容体は免疫機能を持つT細胞分化にも関わっているが、化合物ごとに作用が異なる。そこで、本研究は、新たなAhRリガンドを伝承薬セージから単離し、それらのT細胞分化への効果を調べることで、リガンドごとにT細胞分化制御が異なる機構の解明に繋がることを期待できる。

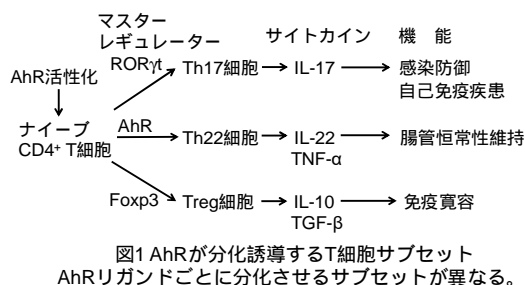
研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR), also known as the dioxin receptor, is involved in promoting the differentiation of three subsets of immune cells, helper T cells: immune-promoting Th17 cell, Th22 cell, and regulatory T cells (Treg). We first identified abietane diterpenoids from sage as AhR ligand. A few of them promoted or inhibited Th17 and Treg differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：AhR 免疫 T細胞 テルペノイド セージ

1. 研究開始当初の背景

AhR は、ほとんどの細胞や組織に存在し、薬物代謝に関わっていることが知られている。そのリガンドとして、ダイオキシンが有名である。しかし、ダイオキシンは人工物であり、その受容体が生体に存在することには疑問が持たれた。そのような中で、AhR の活性化が、免疫に関わる T 細胞の分化に関与していることが明らかになった。T 細胞には複数のサブセットが存在し、その中で、AhR の活性化は、病原菌感染を防ぐ Th17 細胞 (Th17) と、過剰免疫を抑制する機構 (免疫寛容) に関わる Treg 細胞 (Treg) や、腸管での免疫恒常性維持に関わる Th22 細胞 (Th22) への分化誘導に関与する (図 1)。



主な AhR リガンドとして、ダイオキシンの他、トリプトファン (Trp) 代謝物やフラボノイドが知られる。しかし、個々の AhR リガンドによって、分化が誘導される T 細胞サブセットは異なり、ダイオキシンの 1 つは Treg 細胞に、Trp 代謝物の 1 つは Th17 にそれぞれ分化を誘導するが、リガンドによって、分化誘導される T 細胞が異なる機構自身は明らかではない。

また、食品成分による AhR の活性化が、腸管免疫に関わることが示唆されている。例えば、カリフラワー中の Trp 代謝物の胃酸による変換化合物は高 AhR 活性を持ち、腸管免疫を制御することが報告されている。

2. 研究の目的

上記背景のもと、申請者は、フラボノイドを豊富に含み、欧州では伝承薬として扱われるセージの摂取による免疫制御が実現できる可能性を考え、セージ抽出物の AhR 活性を調べた。その結果、抽出物は活性を示したが、数種のセージ含有フラボノイドは不活性であった。このことから、セージは未報告の AhR リガンドを有すると示唆された。そこで、セージから新奇 AhR リガンドを単離、同定するとともに、それらリガンドの T 細胞サブセット分化誘導能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セージに含まれる AhR リガンドの単離、同定

セージのメタノール抽出物からカラムクロマトグラフィー、および分取 HPLC によって、7 つの AhR リガンドを単離した。AhR 活性は、AhR 活性依存のおよび非依存の応答するレポーターを同時に導入したヒト肝がん細胞を用いて、それらの活性比により評価した。AhR リガンドとして単離した化合物は、構造決定のために、NMR や LC-MS 等による機器分析に供した。

(2) AhR リガンドが有する T 細胞サブセットへの分化誘導能の決定

C57BL/6 マウスの脾臓およびリンパ節から、キットにより単離したナイーブ CD4⁺ T 細胞を、Th17、Treg 細胞への分化誘導条件で培養した。その培養条件に単離化合物を添加することで、各細胞への分化に対する影響を調べた。分化誘導率は、Th17 では IL-17、Treg では FoxP3 発現をフローサイトメトリーにより調べることで決定した。

4. 研究成果

(1) セージに含まれる AhR リガンドの単離、同定

セージのメタノール抽出物から、AhR リガンドとして、アビエタン構造を基本骨格とするジテルペンを7つ、単離、同定した(図2)。それらの AhR リガンド活性を調べたところ、全ての化合物で 30 μ M で AhR リガンド活性を示した(図3)。また、そのリガンド活性は、AhR のアンタゴニストである CH-223191 を加えることで阻害された。これまで、ジテルペンに AhR リガンド活性があることは、あまり知られておらず、しかも同一植物から、複数の AhR リガンドが単離、同定された報告もなく、今後の AhR 研究において、ダイオキシンやトリプトファン (Trp) 代謝物、フラボノイドとともに、AhR の機能解析の一助となることが期待できる結果を得ることができた。

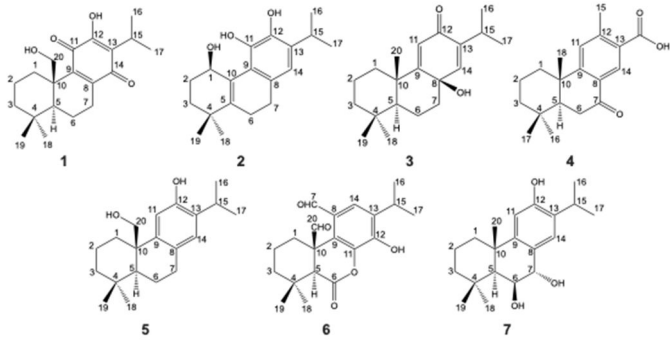


図2 単離した AhR リガンド

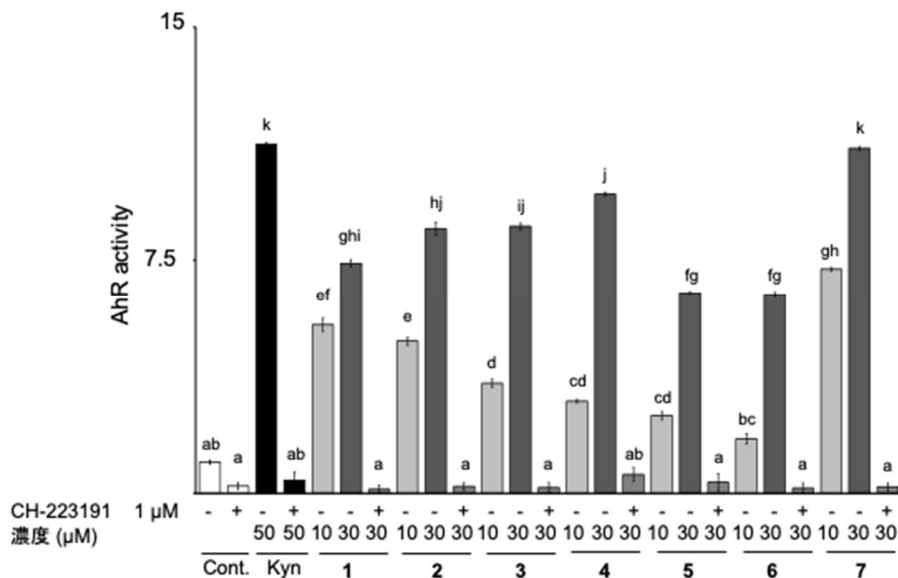


図3 化合物1-7の AhR リガンド活性。コントロールには、DMSO、ポジティブコントロールとしてキヌレニン (Kyn, 50 μ M)を用いた。数値は平均値 \pm SE, n = 3。*, p < 0.05; **, p < 0.01 v.s.コントロール。

(2) AhR リガンドが有する T 細胞サブセットへの分化誘導能の決定

これまで、現研究室で T 細胞分化についての研究を行ったことがないため、まずはナイーブ CD4⁺ T 細胞から Th17 および Treg への分化誘導条件を確立することにした。様々な条件を検討した結果、各細胞への分化誘導率が良い条件を得ることができた。その分化誘導条件に単離化合物の一部を加えて、各細胞への分化誘導に対する効果を調べた。その結果、Th17 誘導において、化合物 3 は、影響を与えなかった。その一方で、化合物 1 は、47%誘導を抑制し、化合物 2 は 77%促進した。そして、化合物 1 および 2 で認められたこれら効果は、CH-223191 との共添加により、打ち消された。このことから、化合物 1 および 2 による Th17 分化誘導への効果には、AhR が関与していることが示唆された。Treg 誘導においては、化合物 1, 2, 5 のいずれでも分化促進効果が認められた。そこで、化合物 1 と CH-223191 を共添加した場合での Treg 分化誘導率を調

べたところ、誘導促進効果は認められたままであった。さらに、Treg 分化誘導条件に CH-223191 のみを加えた場合でも、分化促進効果が認められた。このことから、化合物 1 の添加により認められた Treg 分化誘導促進効果に対する AhR の関与については、不明であり、化合物 2, 5 についても同様と考えられた。

Th17 および Treg 分化誘導条件の確立に時間を要したため、各サブセットへの分化誘導に対する効果は、一部の単離化合物についてのみしか、調べることができなかった。そのような中で、Th17 分化誘導において、化合物ごとに分化誘導に対する効果が異なり、その効果について AhR の関与が示唆されたことから、これら化合物を用いて、AhR リガンドごとに異なる T 細胞サブセットへの分化誘導機構を解明するための足がかりを得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishino Katsutoshi, Someya Kenta, Ksouri Riadh, Ishikawa Toshio, Isoda Hiroko, Irie Kazuhiro, Nagao Masaya	4. 巻 41
2. 論文標題 Abietane diterpenoids from <i>Salvia officinalis</i> leaves as aryl hydrocarbon receptor ligands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 78 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytol.2020.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西野 勝俊、染谷 健太、Riadh Ksouri、石川 敏夫、磯田 博子、入江 一浩、永尾 雅哉
2. 発表標題 セージからのジテルペン型AhRリガンドの単離、同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------