様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１９４７０

研究課題名（和文）新規作用機構を持つアレルギー根本治療薬の開発：リード化合物の標的分子の同定

研究課題名（英文）Development of a novel anti-allergic drug: Identification of target proteins

研究代表者
平澤　典保（Hirasawa, Noriyasu）

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：８０１８１１５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アレルギーに大きく関わると考えられているthymic stromal lymphopoietin (TSLP) の産生を抑制する新規化合物の標的分子並びに作用機構を解析した。まず本化合物に結合する蛋白質を数種同定した。その関与を明らかにするために作用機構を解析したところ、我々が発見した本化合物は、TSLP mRNA の分解を促進することにより、本サイトカインの産生を抑制することを見出した。これらの結果から、これまでのアレルギー薬とは異なった作用点を持つ画期的な抗アレルギー薬になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アトピー性皮膚炎患者は、小児に多く、難治化する傾向があり、近年では成人でも罹患している患者が増えている。副作用の少ない有効な治療薬がなく、アンメットニーズとして新しい機序を持つ薬物の開発が強く望まれている。本研究から、免疫・炎症応答を抑制せず、アレルギーのみを選択的に抑制する作用を持つ本化合物がこれまでにない新たな作用点を持つことが明らかになり、アトピー性皮膚炎の新薬開発に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is known as a master player of allergy. We had found novel compound which inhibits TSLP production, and, in this study, we examined the target and molecular mechanism of it. As the results, we identified several proteins which bind to this compound. We also found that the compound reduced the stability of mRNA for TSLP, resulting in the reduction of the amount of TSLP released. These findings suggested that the compound will be a lead compound for an innovative anti-atopic dermatitis which has a novel mechanism.

研究分野：医療薬学

キーワード：アレルギー　抗アレルギー薬　サイトカイン　上皮細胞

１．研究開始当初の背景

低分子抗アレルギー薬としてこれまで多くの薬物が開発されているが、いずれも症状を緩和するものでしかなく、アレルギーの発症並びに増悪化に関わる免疫応答を抑制する根本的な治療薬はこれまで開発されていない。アレルギー疾患の中で、特にアトピー性皮膚炎の治療薬はステロイド性抗炎症薬並びに免疫抑制薬など重篤な副作用が生じやすいものしかなく、若年層に多いアトピー性皮膚炎にも安心して用いることができる、副作用が少ない薬物の開発が切望されている。そのためにはこれまでにない新たな創薬標的を持つ薬物の開発が不可欠である。

主に上皮細胞が産生するThymic stromal lymphopietin (TSLP)はアレルギー誘発の最上位に位置するサイトカインであり，マウスのみならずヒトにおいてもその重要性が示唆されている。TSLPはリンパ球、マクロファージ等が産生する他の多くのサイトカインと大きく異なり、その主な産生細胞は上皮細胞であること、通常のサイトカイン産生には関与していない上皮細胞特有のシグナル経路がTSLPの産生に関わることから、申請者は、感染抵抗性を低下させずに、TSLP産生を選択的に阻害する薬を開発できる可能性がある。これまで、*in vitro* でTSLP産生を明瞭に誘導することは困難で、これまでTSLP産生をハイスループットで評価する系がなかったが、申請者は恒常的にTSLPを大量に産生する細胞株を発見し、この細胞を用いたTSLP産生阻害薬のフェノタイプスクリーニング系を確立した（*J.Immunol.Methods, 2014*）。すでに約2200種の化合物からスクリーニングを実施し、TSLP産生抑制を抑制するヒット化合物を発見している（特許出願済）。しかし、本化合物のTSLP産生抑制作用機序は未だ不明であった。

２．研究の目的

本研究では、TSLP産生を抑制する本ヒット化合物のTSLP産生抑制作用の分子機序を明らかにすることを目的とし、本化合物が結合する蛋白質を同定し、そのTSLP産生における機能を明らかにすることを目的とした。本成果は、抗アレルギー薬開発の新たな創薬理論を提案するもので、新規抗アレルギー薬開発の再活性化を導くとことを目的とする。

３．研究の方法

(1) ヒット化合物結合蛋白の生化学的同定

ヒット化合物をさらに誘導体化し、より活性の強い化合物を探索した。最も強い作用を示したリード化合物の側鎖に、クリック反応に利用するためアルキンを結合した化合物を合成し、その活性を評価した。親化合物と同様にTSLP産生を抑制する化合物を選択し、これをクリック反応によりアジド-ビーズに結合させ、細胞ライゼートから、結合蛋白質を分画し、SDS-PAGE後、LC/MSで結合タンパク質を同定した。

(2) 作用機構の解析

① Keap1/Nrf2の活性化作用：

本化合物にはこれまで転写因子NF-κBの活性化抑制作用はほとんどないこと、またMAP kinase の活性化抑制もないことを明らかにしている。その化学構造式からKeap1/Nrf2系を活性化する可能性があるため、その寄与についてヒトケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞を用いて解析した。Nrf2レベルはWestern blotにより、また本経路の活性化はHO-1の発現により評価した。また、Nrf2をsiRNAで低下させた時の効果を検討した。

② mRNA 安定性に対する作用：

TNF-αで刺激し、TSLP mRNA が誘導された段階で、本化合物あるいは RNA 合成阻害薬 actinomycin D を添加し、その後の TSLP mRNA の低下速度を測定することにより本化合物の TSLP mRNA の安定化に対する作用を解析した。

４．研究成果

(1) リード化合物結合蛋白の生化学的同定

ヒット化合物をもとに、約 350 種の誘導体を合成し、その活性を評価して、ヒット化合物よりも約 10 倍活性の強い化合物を見出した。もっとも活性の強い化合物の様々な部位にアルキンを結合し、活性を評価し、親化合物と同様の活性を示す３化合物を選択した。これらの化合物をアジド化ビーズにクリック反応により結合させ、細胞サイゼートから結合タンパク質を探索した。その結果、親化合物により結合が阻害されるタンパクが数種類見出された。これらのタンパク質を LC/MS で解析し、数種類のタンパク質を同定した。TSLP 産生抑制作用に寄与するかどうかを推定するために、本化合物の作用機序について検討した。

(2) 作用機構の解析

① Keap1/Nrf2 の活性化作用：本化合物は Keap1 と相互作用し得る部分構造をもつために、Keap1/Nrf2 の活性化について解析したところ、Nrf2 レベルが上昇し、HO-1 の発現が誘導されることが明らかになった。そこで本化合物の TSLP 産生抑制作用の発現に、Keap1/Nrf2 経路の活性化が関与しているかどうか解析した。まず、Keap1 レベルを siRNA で低下させることにより Nrf2 を活性化したときの TSLP の産生を解析したところ、TSLP の発現は影響を受けなかった。また、Nrf2 を siRNA でノックダンした細胞において本化合物の効果を解析した場合でも、本化合物の抑制作用は打ち消されなかった。以上の結果から、Keap1/Nrf2 経路は本化合物により活性化されるものの、TSLP 産生抑制作用には関与していないことが示唆された。

② TNF-α刺激による TSLP mRNA の発現を本化合物は低下させるが、本化合物に TSLP mRNA の安定性を低下させる作用があるかどうか解析した。TNF-α刺激により TSLP mRNA レベルを上昇させたのち、actinomycin D あるいは本化合物を処理し、経時的に mRNA 残量を測定した。その結果、本化合物は actinomycin D よりも強く TSLP mRNA レベルを低下させたことから、TSLP mRNA の分解を促進する作用があることが示唆された。また、その抑制作用は actinomycin D と併用することにより打ち消されたことから、本化合物は miRNA 等の合成を介して、TSLP mRNA の分解を高めている可能性が示唆された。

以上のように、TSLP 産生を抑制する新規化合物の作用機構及び標的分子を解析した。本化合物に結合するタンパク質は数種類見出された。作用機構の解析から、本化合物は miRNA 等の合成を介して、TSLP mRNA の不安定化を誘導している可能性が示唆された。同定された本化合物の結合タンパク質の中に、miRNA の合成に関わるもの、核外輸送に関わるものがあり、今後その結合による活性影響と役割について検討する予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 ７件）

1) Y. Weng, J. Wang, Z. Yang, M. Xi, J. Duan, C. Guo, Y. Yin, R. Segawa, T. Moriya, T. Yonezawa, BY. Cha , JT. Woo, A. Wen, N. Hirasawa. A steroid alkaloid derivative 02F04 upregulates thymic stromal lymphopoietin expression slowly and continuously through a novel Gq/11-ROCK-ERK1/2

signaling pathway in mouse keratinocytes. **Cell Signal.** 57 (2019): 58-64 (doi: 10.1016/j.cellsig.2019.01.005.) **（査読あり）**

2) Segawa R, Shiraki M, Sudo S, Shigeeda K, Saito T, Mizuno N, Moriya T, Yonezawa T, Woo JT, Hiratsuka M, Hirasawa N. A chalcone derivative suppresses the induction of TSLP in mice and human keratinocytes and attenuates OVA-induced antibody production in mice. **Eur J Pharmacol.** 851 (2019): 52-62. (doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.007.) **（査読あり）**
3) T. Hatayama, R. Segawa, N. Mizuno, S. Eguchi, H. Akamatsu, M. Fukuda, F. Nakata, WJ. Leonard, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. All-trans retinoic acid enhances antibody production by inducing the expression of thymic stromal lymphopoietin protein. **J. Immunol.** 200 (2018) 2670-2676 (doi: 10.4049/jimmunol.1701276) **（査読あり）**
4) R. Segawa, K. Shigeeda, T. Hatayama, M. Shiraki, N. Mizuno, T. Moriya, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. EGFR transactivation is involved in TNF-α-induced expression of thymic stromal lymphopoietin expression in human keratinocyte cell line. **J. Dermatol. Sci.** 89 (2018) : 290-298 (doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.12.008) **（査読あり）**
5) S. Asakawa, R. Onodera, Y. Kishimoto, T. Sato, R. Segawa, N. Mizuno, K. Ogasawara, T. Moriya, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. Nickel ions bind to HSP90β and enhance HIF-1α-mediated IL-8 expression. **Toxicology** 395:45-53 (2018) (doi: 10.1016/j.tox.2018.01.006) **（査読あり）**
6) R. Onodera, S. Asakawa, R. Segawa, N. Mizuno, K. Ogasawara, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. Zinc ions attenuate Ni ion-induced inflammation. **Sci. Rep.** 8(2018) : 2911. (doi: 10.1038/s41598-018-21014-8) **（査読あり）**
7) Y. Weng, N. Mizuno, J. Dong, R. Segawa, T. Yonezawa, B. Y. Cha, J.T. Woo, T. Moriya, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. Induction of thymic stromal lymphopoietin by a steroid alkaloid derivative in mouse keratinocytes. **Int. Immunopharm**. 55 (2018): 28-37 (doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.045) **（査読あり）**

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

６．研究組織

(1)研究分担者 なし
(2)研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。