

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19310135

研究課題名 (和文) 微生物の自然免疫制御物質の探索と活性発現機構の解明

研究課題名 (英文) Search for Natural Products Regulating Innate Immunity and Analysis of Their Mode of Actions

研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00111302

研究成果の概要：自然免疫は、貪食細胞の活性化、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインの産生により微生物を排除する生体防御機構である。自然免疫は炎症、免疫、感染、アポトーシスなどに関連することから、その制御物質は創薬に役立つと考えられている。我々は、微生物に含まれる自然免疫制御物質を探索した。その結果、2種の化合物を活性物質として単離した。それらの作用機構が明らかになり、新しいタイプの抗炎症薬、感染防御薬、敗血症治療薬が開発されることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：微生物、自然免疫、天然物

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫制御物質の探索とその活性発現機能の解析

哺乳類には、細菌などの外敵から自らを防御する手段として、高度な免疫機能が備わっている。その中で、一度感染した外敵の情報を記憶して次回の感染に備える獲得免疫に対して、細菌などの微生物の表層分子に存在する共通構造（例えば、ペプチドグリカン）を認識して活性化される防御機構を自然免疫という。自然免疫は、微生物を認識し、貪食細胞の活性化、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインの産生により微生物

物を排除する。近年、ヒト TLR (Toll 様受容体) が昆虫の免疫において重要な役割を果たす Toll 受容体のホモログとして発見され (R. Medzhitov et al., *Nature*, 388, 394-397 (1997))、哺乳類と昆虫の自然免疫が高い類似性をもつことが明らかになった。ヒト TLR の発見は、昆虫の自然免疫制御物質が、哺乳類の自然免疫をも制御する可能性を示唆する。さらに、ヒトの自然免疫が獲得免疫の成立にも深く関わっていることが示され (S. Akira et al., *Nat. Immunol.*, 2, 675-678 (2001))、現在では、自然免疫異常は炎症、免疫、感染、アポトーシスな

ど多岐にわたる疾患に関係することが明らかになっている。これまで、ヒトの自然免疫経路に関与する NF- κ B などの幾つかの因子に対する個別の阻害剤研究はなされている。しかし、微生物の認識から遺伝子の発現に至る自然免疫経路全体に渡る制御物質の探索は全く行われていない。我々は、その機能が十分に活用されていない昆虫に注目し、遺伝子組み換えショウジョウバエを用いて重要な自然免疫経路である IMD 経路に対する活性を検出する独自のスクリーニングを確立した (M. Yajima et al., *Biochem. J.*, 371, 205-210 (2003); M. Sekiya et al., *Life Sci.*, 80, 113-119 (2006))。

(2) 昆虫寄生菌の薬理活性物質の探索

昆虫を用いた自然免疫制御物質の研究の過程において、我々は昆虫寄生菌の1種である黒姜病菌から、ジテルペノイドと α -ピロンが縮合した構造をもつ新規化合物 **3** を単離した。化合物 **3** は、がん細胞に対して強い増殖抑制作用を示す。加えて、がん細胞パネルを用いた細胞毒性試験によれば、がん細胞の種類によってその効果には高い選択性が認められた。この選択性は、**3** の細胞内標的分子はユニークな分子であることを示唆する。これまで、数種の類縁体が単離され、それらは骨粗鬆症や自己免疫疾患治療薬として強い期待が寄せられている。しかし、これらの化合物に関しては系統的な化学、生物学的研究は全く行われていない。

2. 研究の目的

(1) 自然免疫制御物質の探索とその活性発現機能の解析

我々が確立した遺伝子組み換えショウジョウバエを用いて自然免疫制御活性を検出するスクリーニング (昆虫の病原体排除反応を制御する物質の探索系) によって、微生物バンクを有する研究機関の協力のもとで大幅に拡大したスクリーニングサンプルから自然免疫制御物質を探る。その後、本スクリーニングによって得られる自然免疫制御物質の哺乳類の自然免疫に対する作用を検討する。同時に、自然免疫制御物質の昆虫と哺乳類に対する作用機構を明らかにする。

(2) 昆虫寄生菌の薬理活性物質の探索

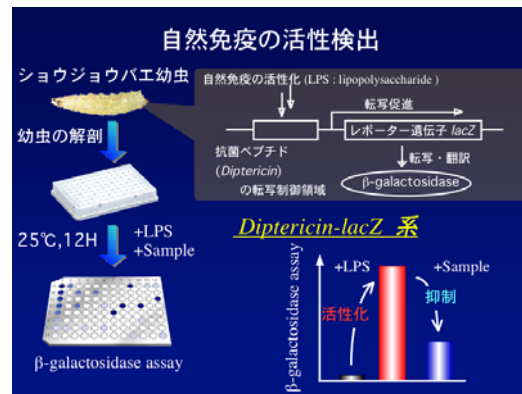
これまでに実施したスクリーニングの過程で見出された強力な細胞毒性を有する昆虫寄生菌成分の化学・生物学的性質を系統的に明らかにする。すなわち、昆虫寄生菌である黒姜病菌から、我々が単離した成分 **3** の構造を確定する。さらに、**3** の各種誘導体を合成し、細胞毒性に関する構造-活性相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 自然免疫制御物質の探索とその活性発現機能の解析

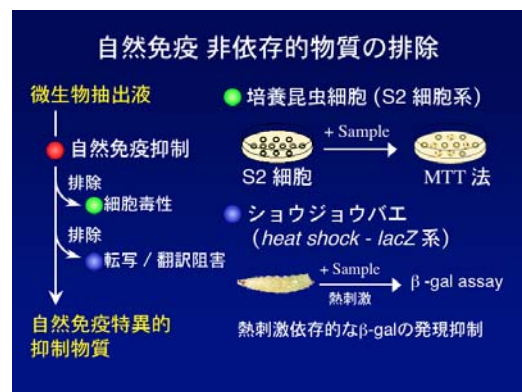
①スクリーニング

ペプチドグリカンによる自然免疫活性化に対するサンプルの抑制作用：スクリーニングには、抗菌ペプチドの1種であるジプテリシンの産生遺伝子の転写制御領域にレポーター遺伝子 *lacZ* をつないだ外来遺伝子を導入したショウジョウバエ幼虫を用いた。ペプチドグリカン刺激による自然免疫活性化に対するサンプルの抑制作用を β -ガラクトシダーゼ活性を測定することで検出した (下図)。



サンプルの自然免疫活性化作用：同様な遺伝子導入ショウジョウバエ幼虫を用い、ペプチドグリカンによる自然免疫活性化を施さないことにより、サンプルの自然免疫活性化作用を測定した (下図)。

自然免疫非依存的サンプルの排除：上記スクリーニングでは、自然免疫に対して特異的に作用する物質に加えて、細胞毒性や転写翻訳阻害活性を有する物質も同時に検出される。したがって、昆虫S2細胞を用いたMTT法、*heat shock-lacZ*系によるアッセイを組み合わせることにより、自然免疫非特異的な物質を排除した (下図)。



②自然免疫制御物質の哺乳類の自然免疫に対する作用

単離した自然免疫制御物質について、哺乳類細胞を用いて、自然免疫の活性化により誘導されるサイトカインであるIL-8、MCP-1の産生量への影響を検討した。

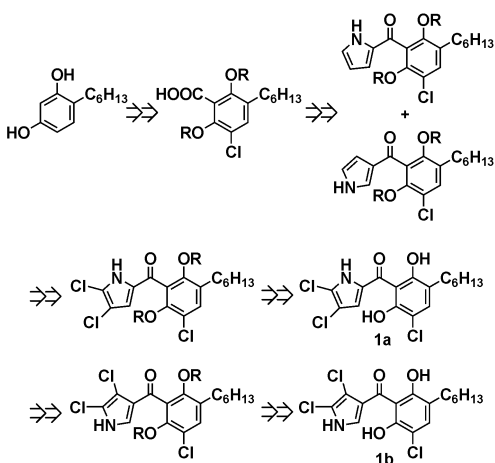
(2) 昆虫寄生菌の薬理活性物質の探索

黒姜病菌成分 **3** の構造決定とその誘導体の合成、哺乳類細胞に対する細胞毒性の構造-活性相関：**3** の構造を決定するために、機器分析データの解析および化学変換を行った。さらに、**3** の3位に結合するエステル部の構造変換体を調製するとともに、得られた誘導体の細胞毒性を検討した。

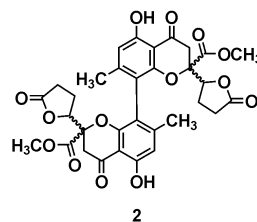
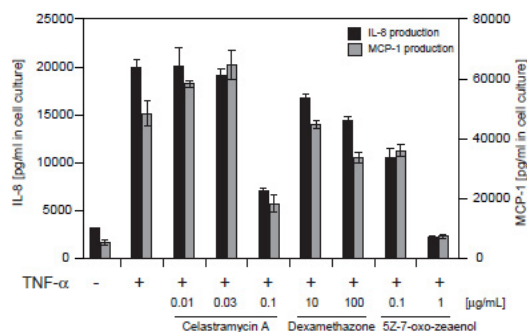
4. 研究成果

(1) 自然免疫制御物質の探索とその活性発現機能の解析

われわれが独自に開発した遺伝子組み換えシヨウジョウバエを用いたアッセイを用いて、約8,000種の微生物抽出物の自然免疫制御作用をスクリーニングした結果、ベンゾイルピロール系化合物であるセラストラマイシン A (**1**) と新規なジヒドロベンゾピロン誘導体 **2** を、それぞれ自然免疫抑制および活性化物質として単離した。さらに、セラストラマイシン A に対して提示されていた2種の構造異性体 **1a**, **1b** (C. Pullen et al., *Planta*, 216, 162 (2002); 早瀬善男ら, 特許公報 W099/53758, 1999年10月28日) を下式のルートで合成することにより、その構造を **1a** と確定した。



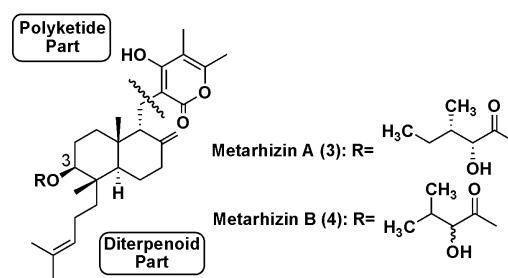
セラストラマイシン A は、0.01 $\mu\text{g/ml}$ でシヨウジョウバエの自然免疫を強く抑制した。さらに、セラストラマイシン A は、哺乳類細胞を使った実験では、炎症性肺疾患や急性、慢性リュウマチ患者で亢進しているケモカインである IL-8, MCP-1 の産生を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で抑制した (下表)。



一方、ジヒドロベンゾピロン誘導体 **2** は、10 $\mu\text{g/ml}$ でシヨウジョウバエの自然免疫系を上昇させた。

(2) 昆虫寄生菌の薬理活性物質の探索

自然免疫制御物質を探索している過程で、昆虫寄生菌の1種である黒姜病菌を大量に培養して得た培養液から強烈な細胞毒性を示す新規なジテルペナーピロン系化合物メタリジン A, B (**3**, **4**) を単離した。両化合物の化学構造は、物理化学的データと相互の化学変換等により決定した。さらに、各種誘導体を合成して、3位のアシル基や α -ピロン環の活性に対する影響を調べたところ、 α -ピロン環は γ -ピロン環を有する異性体となった後に活性を発現することが示唆された。また、強い活性を示すためには、適度な脂溶性をもつアシル基が3位に結合していることが必要であることが明らかになった。



本研究によって得られたセラストラマイシン A と新規なジヒドロベンゾピロン誘導体 **2** は、多様性に富む誘導体を合成的手段によって得ることが可能な構造をもつ。したがって、両化合物が鍵物質となり、新たなタイプの抗炎症薬、感染防御薬、敗血症治療薬等の開発が進むことが期待される。

また、従来、数種のジテルペナーピロン系化合物が単離され、それらの薬理作用に興味

がもたれていた。メタリジン A, B (3, 4) の単離は、ジテルペナーピロン系化合物が創薬における新しいタイプのリード化合物であることを示唆する。

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 3 件)

- ① Haruhisa Kikuchi, Mizuki Sekiya, Yasuhiro Katou, Kazunori Ueda, Takehiro Kabeya, Shoichiro Kurata and Yoshiteru Oshima, Revised Structure and Synthesis of Celastramycin A, a Potent Innate Immune Suppressor, *Org. Lett.*, in press (2009). 査読有
- ② Haruhisa Kikuchi, Tomoko Hoshi, Minoru Kitayama, Mizuki Sekiya, Yasuhiro Katou, Kazunori Ueda, Yuzuru Kubohara, Hiroki Sato, Mitsuaki Shimazu, Shoichiro Kurata and Yoshiteru Oshima, New Diterpene Pyrone-type Compounds, Metarhizins A and B, Isolated from Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium flavoviride* and Their Inhibitory Effects on Cellular Proliferation, *Tetrahedron*, 65, 469-477 (2009). 査読有
- ③ Mizuki Sekiya, Kazunori Ueda, Kaori Okazaki, Haruhisa Kikuchi, Shoichiro Kurata and Yoshiteru Oshima, A Cyclopentanediol Analogue Selectively Suppresses the Conserved Innate Immunity Pathways, *Drosophila* IMD and TNF- α Pathways, *Biochem. Pharmacol.*, 75, 2165-2174 (2008). 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 菊地晴久, 磯辺真人, 関谷瑞樹, 上田和則, 加藤泰弘, 倉田祥一朗, 大島吉輝, 自然免疫活性化作用を有する糸状菌由来成分の構造と合成研究, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 京都.
- ② 菊地晴久, 有泉加奈子, 関谷瑞樹, 上田和則, 倉田祥一朗, Haska Nadirman, 大島吉輝, インドネシア由来微生物より得られた新規二次代謝産物, 第 47 回日本薬学会東北支部大会, 2008 年 10 月 26 日, 盛岡.
- ③ Haruhisa Kikuchi, Mizuki Sekiya, Kaori Okazaki, Kazunori Ueda, Yasuhiro Katou, Shoichiro Kurata, Yoshiteru Oshima, Exploration of New Immune Regulators from Natural Resources, THE 20TH FRENCH-JAPANESE SYMPOSIUM ON MEDICINAL AND FINE CHEMISTRY, 2008 年 9 月 8 日, フランス・ボルドー.
- ④ 菊地晴久, 有泉加奈子, 関谷瑞樹, 上田和則, 倉田祥一朗, Haska Nadirman, 大島吉

輝, インドネシア産微生物における新規二次代謝産物の探索, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.

- ⑤ 菊地晴久, 関谷瑞樹, 岡崎香織, 上田和則, 倉田祥一朗, 大島吉輝, 昆虫機能を利用した自然免疫制御物質の探索と創薬への展開, 第 49 回天然有機化合物討論会, 2007 年 9 月 19 日, 札幌.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ピロール化合物を有効成分として含有するケモカイン産生阻害剤

発明者: 倉田祥一朗, 菊地晴久, 加藤泰弘, 大島吉輝

権利者: 東北大学

種類: 特許権

番号: 2009-17200

出願年月日: 2009 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

00111302

(2) 研究分担者

菊地晴久 (KIKUCHI HARUHISA)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

90302166