

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07492

研究課題名(和文) 新たな阻害作用機序を示す次世代抗インテグリン薬の開発

研究課題名(英文) Development of next generation integrin inhibitor having a novel inhibitory manner

研究代表者

今 重之 (Kon, Shigeyuki)

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：90344499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しいインテグリン機能阻害様式を有する 4インテグリンスプライシングバリエント(4SV)とメチマゾールによる自己免疫疾患への影響を検討した。4SVは、4と9インテグリンとそれらが共通するリガンドのみの接着を阻害し、さらにTh17分化も抑制することで自己免疫疾患を抑制させる機能を有する事が分かった。メチマゾールに関しては、9インテグリンスプライシングバリエントSF9と結合するFM04機能を阻害し、9インテグリン活性化を抑制させることが分かった。また、メチマゾールのマウスへの投与は9インテグリンが増悪化に関与する自己免疫疾患マウスを抑制させることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インテグリンは魅力的な医薬標的として知られるが、生体の維持にも重要な役割を有することから、インテグリン機能の完全な阻害は強い副作用をもたらすことが危惧されている。本研究では、インテグリン機能を完全には阻害しない新たな反応性を有する二つの物質を見出した。4インテグリン変異体は、インテグリンと受容体との結合をリガンド選択性を有しながら阻害し、自己免疫疾患を誘発するT細胞であるTh17分化をも抑制した。抗甲状腺薬メチマゾールは9インテグリン活性化を特異的に抑制することが分かった。今後、これら新しいインテグリン機能阻害様式をより詳細に解析することで、医薬への発展を目指す。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the functions of an alpha4 integrin splicing variant (alpha4SV) and methimazole which have novel integrin inhibitory effects. Alpha4SV inhibited autoimmune diseases via blocking of Th17 differentiation as well as the binding between alpha4 or alpha9 integrin and their common ligands. Methimazole (a major anti-thyroid drug) is known as flavin-containing monooxygenase (FMO) inhibitor. We found that FM04 is associated with an alpha9 integrin splicing variant SFalpha9 which is alpha9 integrin activator. Methimazole blocked the activation of alpha9 integrin. Methimazole administration ameliorated alpha9 integrin-dependent autoimmune murine models such as rheumatoid arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

研究分野：実験医学

キーワード：インテグリン スプライシングバリエント 自己免疫疾患 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、生物学的製剤の発展により新たな治療法が開発されてはいるものの、これらが効かない患者や有効な治療法のない疾患が多く存在することから、新たな作用機序を有する治療法の確立は急務である。

細胞外基質との細胞接着を司る細胞膜貫通タンパク質群であるインテグリンは、多くの難治性疾患発症に関与することから多くの阻害剤が開発されているが、ほとんどが医薬まで発展していない。その理由として、インテグリン阻害剤は標的インテグリンと複数のリガンドとの相互作用を完全に阻害してしまうことで生体に強い影響を与えてしまうことが原因と考えられている。インテグリンが創薬標的分子群であることは疑いようがないものの、現状のアプローチによるインテグリン阻害剤の開発は重篤な副作用の危険性が常に付きまとう。

## 2. 研究の目的

当研究室では、同一のインテグリンファミリーに属し、自己免疫疾患発症に関与する 4 インテグリンと 9 インテグリンに着目して研究を進めた結果、インテグリンとリガンドとの相互作用を完全には阻害しない物質として 4 インテグリンスプライシングバリエーション (4SV) と抗甲状腺薬メチマゾールを見出した。

4 と 9 インテグリンは、数種のリガンドを共有するが、4SV は 4 のみならず 9 インテグリンとオステオポンチン等のそれらの共有リガンドとの細胞接着を抑制することを明らかにした。一方で、VCAM-1 やファイブロネクチン CS1 等の 4 インテグリン特異的リガンドに対しては阻害効果を示さないことから、4SV はリガンド選択性を有する阻害分子であることが分かった。また、4SV の結合分子として TGF- $\beta$  を見出した。TGF- $\beta$  は、自己免疫疾患に関与する T 細胞サブセット Th17 分化に重要な因子であることから、4SV は Th17 分化にも影響を与える可能性を見出した。

従来のリガンドと受容体との結合阻害ではなく、インテグリン不活性化型から活性化の段階を阻害できれば、不活性化型インテグリンには作用しない新たなインテグリン阻害剤になることが提唱されている。当研究室では 9 スプライシングバリエーション SF 9 が、9 インテグリン特異的活性化分子であることを報告していることから、SF 9 機能阻害剤は 9 インテグリン活性化阻害剤になると予想した。SF 9 結合分子として薬物代謝酵素 FMO4 を見出し、FMO 阻害剤としてメチマゾールが存在することから、メチマゾールは 9 の特異的活性化阻害剤になり得ると考え、実際にメチマゾールが 9 インテグリン活性化抑制能を有することを明らかにした。

そこで本研究では、4SV やメチマゾールが持つ新たなインテグリン阻害作用機序が自己免疫疾患抑制効果を有すること、そしてそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 4SV、メチマゾールによる自己免疫疾患抑制効果：

4SV、メチマゾールによるリウマチ関節炎や多発性硬化症モデルに対する阻害効果を検討した。4SV は腹腔に投与し、メチマゾールは経口投与で検討した。リウマチ関節炎モデルは、コラーゲン II に対する抗体カクテルと LPS を併用したいわゆる CAIA モデルを BALB/c マウスを用いて発症させた。多発性硬化症モデルは、myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ペプチドと百日咳毒素を併用した EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) モデルを C57BL/6 モデルを用いて発症させた。

### 4SV による TGF- $\beta$ 機能抑制効果：

TGF- $\beta$  機能抑制効果は、TGF- $\beta$  シグナルで転写される PAI-1 とルシフェラーゼ融合遺伝子を恒常的に発現する TMLC 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行うことで検討した。

#### 4. 研究成果

4SV の腹腔内投与による自己免疫疾患抑制能を CAIA モデルと EAE での検討を行った結果、4SV 投与により関節炎スコアや EAE スコアが抑制できることが分かった。また、同時に 4SV 投与による Th17 分化に与える影響を EAE マウス由来脾細胞からヘルパー T 細胞を分離して検討した結果、4SV 投与後のヘルパー T 細胞では有意に IL-17 や ROR- $\gamma$  T の発現が低下していることが分かり Th17 分化を抑制していることを示唆する結果を得た。

4SV による Th17 分化の抑制は TGF- $\beta$  が 4SV と結合することによる TGF- $\beta$  機能変化が影響するのかが検討するするため、内在的に TGF- $\beta$  を発現する TMLC 細胞に 4SV 遺伝子を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。4SV 遺伝子の導入により、ルシフェラーゼ活性が低下することが分かった。このことは 4SV が TGF- $\beta$  活性化を阻害し TGF- $\beta$  とその受容体からのシグナルを抑制すると推察できた。

メチマゾールを毎日投与する条件で CAIA モデルと EAE モデルの病態変化を検討した結果、両モデルともメチマゾール投与により病態スコアを著しく改善できることが分かった。メチマゾールは、FM04 遺伝子を導入した  $\alpha$ 9 インテグリン発現細胞では細胞接着を抑制したが、 $\alpha$ 9 インテグリン単独発現細胞では抑制能を示さなかったことから、FM04 が  $\alpha$ 9 インテグリン活性化に関与することを示唆する結果を得た。そこで、FM04 が  $\alpha$ 9 インテグリン活性化に関与することを明らかにするため、FM04 と  $\alpha$ 9 インテグリンを内在的に共発現するヒト胎児横紋筋肉腫 RD 細胞株の FM04 を Crispr/Cas9 にてノックアウトした細胞を作製し、細胞接着試験した結果、 $\alpha$ 9 インテグリン依存性細胞接着を抑制できることが分かった。一方で、細胞膜上の  $\alpha$ 9 インテグリン発現は不変であったことから FM04 は  $\alpha$ 9 インテグリンを活性化させる機能を有することが分かった。

メチマゾールは抗甲状腺薬として古くから臨床で使われている医薬である。メチマゾールの副作用としては体重減少がよく知られており、当研究室においてもメチマゾールをマウスへ投与すると体重が大きく減少する。そこで、メチマゾール類縁体を 11 種類作製して、体重減少への影響が少なく自己免疫疾患の増悪化抑制できる化合物の探索を行った。その結果、1 つの化合物が  $\alpha$ 9 インテグリン活性化阻害能を有し、マウス投与による体重減少がほとんど見られないことが分かった。現在、当該化合物による自己免疫疾患抑制能を検討している。

以上の結果から、インテグリンとリガンドとの相互作用を完全には阻害しない 4SV とメチマゾールは自己免疫疾患抑制能を有することを明らかにできた。4SV の自己免疫疾患抑制メカニズムは、 $\alpha$ 4 と  $\alpha$ 9 インテグリンと  $\alpha$ 4 と  $\alpha$ 9 インテグリン共有リガンドとの接着のみならず Th17 分化阻害によると推察できた。また、メチマゾールに関しては強い自己免疫疾患抑制能を有することが分かり、さらにメチマゾールによる体重減少が抑制できるメチマゾール類縁体を見出すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Spentle Caroline, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Tenascin-C Orchestrates an Immune-Suppressive Tumor Microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1122 ~ 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-20-0074	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 該当する
1. 著者名 Dhanesha Nirav, Jain Manish, Tripathi Amit K., Doddapattar Prakash, Chorawala Mehul, Bathla Girish, Nayak Manasa K., Ghatge Madankumar, Lentz Steven R., Kon Shigeyuki, Chauhan Anil K.	4. 巻 126
2. 論文標題 Targeting Myeloid-Specific Integrin $\alpha$ 9 $\beta$ 1 Improves Short- and Long-Term Stroke Outcomes in Murine Models With Preexisting Comorbidities by Limiting Thrombosis and Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 1779 ~ 1794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.120.316659	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 該当する
1. 著者名 Honda Machiko, Kimura Chiemi, Uede Toshimitsu, Kon Shigeyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 223 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-020-00554-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dhanesha Nirav, Nayak Manasa K., Doddapattar Prakash, Jain Manish, Flora Gagan D., Kon Shigeyuki, Chauhan Anil K.	4. 巻 135
2. 論文標題 Targeting myeloid-cell specific integrin $\alpha$ 9 $\beta$ 1 inhibits arterial thrombosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 857 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002846	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 該当する

1. 著者名 Kon Shigeyuki, Honda Machiko, Ishikawa Kiyoshi, Maeda Masahiro, Segawa Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibodies against nephronectin ameliorate anti type II collagen induced arthritis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 107 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dhanesha N, Jain M, Tripathi A, Doddapattar P, Chorawala M, Bathla G, Nayak MK, Ghatge M, Lentz SR, Kon S, Chauhan AK.	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting Myeloid-Specific Integrin $\alpha$ 9 1 Improves Short and Long-Term Stroke Outcomes in Murine Models With Preexisting Comorbidities by Limiting Thrombosis And Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.120.316659	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 該当する

1. 著者名 Honda M, Kimura C, Uede T, Kon S	4. 巻 -
2. 論文標題 Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-020-00554-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dhanesha N, Nayak MK, Doddapattar P, Jain M, Flora GD, Kon S, Chauhan AK.	4. 巻 135
2. 論文標題 Targeting myeloid-cell specific integrin $\alpha$ 9 1 inhibits arterial thrombosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 857 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002846	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 該当する

1. 著者名 Kon S, Honda M, Ishikawa K, Maeda M, Segawa T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibodies against nephronectin ameliorate anti type II collagen induced arthritis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 107 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee S, Honda M, Yamamoto S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y, Sada N, Kon S, Otsuki T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of Nephronectin in Pathophysiology of Silicosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2581 ~ 2581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本田真知子、斎藤芳郎、今 重之
2. 発表標題 細胞外基質ネフロネクチンはCD4+T細胞内の活性酸素種 (ROS) 介したTh17/Tregバランス制御により自己免疫疾患増悪化に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 柴田 紗知、海切 弘子、桜井 奏慧、前原 昭次、浦 大樹、硯 澄仁、新井田 要、萱島 知子、味八木 茂、松原 主典、今 重之
2. 発表標題 カルノシン酸及びピシフェリン酸の加齢性疾患予防効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 福永 真実、西山 卓志、本田 真知子、町枝 臣成、今 重之
2. 発表標題 副作用軽減を期待できるメチマゾール類縁体を用いた自己免疫疾患抑制効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 本田真知子、斎藤芳郎、今 重之
2. 発表標題 ネフロネクチンはCD4+T細胞内のROSを介したTh17とTregのバランス制御によってEAE増悪化に関与する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 本田真知子、斎藤芳郎、今 重之
2. 発表標題 細胞外基質ネフロネクチンのT細胞内の活性酸素種（ROS）介したTh17とTregのバランス制御による自己免疫疾患増悪化に関する検討
3. 学会等名 第59回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大槻 剛巳、武井 直子、伊藤 達夫、吉留 敬、西村 泰光、本田 真知子、今 重之、李 順姫
2. 発表標題 珪肺症の病態生理におけるネフロネクチンの役割
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細胞外基質ネフロネクチンはセレノプロテインPと相互作用する
2. 発表標題 本田真知子、斎藤芳郎、今 重之
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福永真実、本田真知子、今 重之
2. 発表標題 新規 4インテグリンスプライシングバリエントを用いた自己免疫疾患治療戦略
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田康平、本田真知子、今 重之
2. 発表標題 4インテグリンスプライシングバリエントの結合分子の探索と機能解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田真知子、斎藤芳郎、今 重之
2. 発表標題 セレノプロテインPとの相互作用による細胞外基質ネフロネクチンのグルタチオンペルオキシダーゼ誘導の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子免疫学研究室の研究概要  
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/pharm/pharmacy/labo-list/mol-immun/>  
関節リウマチの悪化に関する新たな分子の発見（プレスリリース）  
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/news/29089/>  
非アルコール性脂肪肝炎の新たな治療薬への期待！（プレスリリース）  
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/news/31404/>  
免疫制御に関わる新たな分子メカニズムの発見！（プレスリリース）  
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/blog/66458/>  
Researchers Identify Potential Target for Treating Autoimmune Diseases（プレスリリース）  
<https://www.physiology.org/detail/news/2022/05/17/researchers-identify-potential-target-for-treating-autoimmune-diseases?SS0=Y>

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
研究協力者	本田 真知子  (Honda Machiko)  (30568548)	福山大学・薬学部・助手    (35409)	

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
---------	---------