

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16393

研究課題名（和文）免疫チェックポイントに作用する伝統医薬品・天然由来化合物の探索と有効性解析

研究課題名（英文）Search for traditional drugs and naturally derived compounds that act on immune checkpoints and analyze their effectiveness

研究代表者

小谷 仁司 (Kotani, Hitoshi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：10594640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、最先端医療技術の開発で新たに発見されてきたメカニズムに焦点を当て、同様なメカニズムを持つ伝統医薬品や天然由来化合物を探索することをおこなった。しかし研究の結果、抗体医薬品ほど特異的に作用する薬剤は見つけれず、容易には抗体薬品を置き換えることは困難であることが明らかとなった。しかし、加齢とともに免疫が低下することと加齢性疾患の予防・治療が超高齢化社会において取り組むべき重要な課題であり、抗体医薬品とは異なる間接的な方法で、医薬品開発をおこなう必要もあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抗体医薬品などが特異性が高く、容易に同等なメカニズムを持つ低分子化合物の発見をすることは難しいことが明らかとなった。その点において、高価な抗体医薬品などの生物学的製剤の有用性が示された。しかし、低分子製剤や伝統医薬品など安定性が高く、安価であり、経口投与が可能な医薬品のほうが多くの人々にとって有用であることは間違いないことから、このような医薬品の新しいメカニズムの解析研究も見直されるべきである。最先端の医薬品と昔ながらな医薬品の両輪を進めながら医薬品開発を進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：In this research, we focused on the mechanism newly discovered in the development of cutting-edge medical technology, and searched for traditional medicines and naturally derived compounds with similar mechanism. However, as a result of research, it has become clear that it is difficult to find a drug that acts as specifically as an antibody drug, and it is difficult to easily replace the antibody drug. However, the decline in immunity with aging and the prevention and treatment of age-related diseases are important issues that should be addressed in a super-aging society, and it is also necessary to develop drugs by an indirect method different from antibody drugs.

研究分野：天然物化学・免疫学

キーワード：免疫チェックポイント 生薬 天然物 PD-1 PD-L1 低分子化合物 タンパク質間相互作用 T細胞

1. 研究開始当初の背景

日本の医療は西洋医学の飛躍的発展によって国民の福利厚生に大きく貢献したが、超高齢化社会の到来と共に、これまで以上にQOLを重視した医療・予防面での充実、医療の効率化などが求められている。そこで、日本の伝統医療である民間薬や漢方方剤などを見直し、状況や必要に応じて東西の医学を組み合わせたり、使い分けをしていくことが今後の医療において重要であると考えられる。このような観点から、私はこれまで漢方方剤や生薬をはじめとする伝統医薬品などの薬理的な根拠を提供し、これらの伝統医薬品の利用促進につながるような研究を行ってきた。近年多くの最先端医療技術の開発により、抗体医薬品・核酸医薬品といったバイオ医薬品の臨床応用や、iPS細胞などの臨床応用など、これまで治療が困難であった病気の治療にも効果をあげることができてきている。しかし、このような最先端医療の一つである抗体医薬品は、その薬価が非常に高いことから、まだまだ我が国の国民が気軽に治療を受けることができる状況とはなっていない。さらに、免疫チェックポイントの一つであるPD-1に対する抗体医薬品であるオプジーボなどは、その治療効果が優れていることから、使用を希望する患者が多くいることもあり、我が国の保険医療の経済的な破綻を引き起こしかねないと考えられている。このような問題がある中で、新しく発見された治療方法のメカニズム(免疫チェックポイント阻害剤においてはT細胞の疲弊化解除)を、伝統医薬品(漢方方剤・生薬など)の薬理作用に対する再評価の指標として利用することで、結果として伝統医薬品の利用促進に繋がると考えられる。また活性成分の同定に関しては、抗体医薬品を代替えることが出来る低分子医薬品のリード化合物として、新たな創薬に繋がる可能性を有していると考えられる。

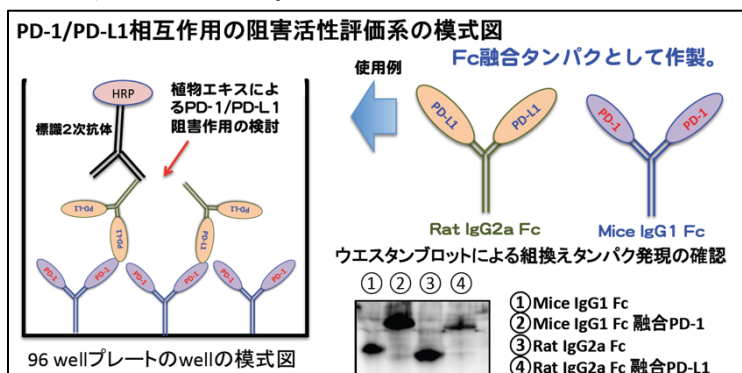
2. 研究の目的

本研究では、最先端医療技術の革新から得られた新たな治療方法(新たな生命現象に関する知見など)を、漢方方剤や民間薬・生薬などの伝統医薬品および、その含有される天然化合物に適応させて、天然由来の新たな免疫チェックポイント阻害剤を開発することを目的とし、研究を進めることとした。本研究により、伝統医薬品の中に免疫チェックポイント阻害活性を見出すことで、これまでの使用方法を見直し、その有効性を評価することができることと、新たな薬理効果として、科学的なメカニズムを明らかにした伝統医薬品を、臨床応用につなげることが可能となる。また、その活性成分を明らかにすることにより、その天然化合物をリード化合物として、より強力な免疫チェックポイント阻害剤の開発に貢献できると考えられる。これらの研究成果は、安価で安定性の高い低分子化合物医薬品または伝統医薬品などの免疫チェックポイント阻害剤開発に繋がり、より多くの患者が安価に治療を受けることが出来る医薬品として、社会に還元することができる研究成果に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 免疫チェックポイント組換えタンパクの作製

免疫チェックポイントの一つであるPD-1に対して、そのリガンドであるPD-L1が結合すると、T細胞などの免疫細胞において分裂増殖や分化、サイトカイン産生などが起きず(これを免疫疲弊と呼ぶ)、免疫抑制作用が生じてしまうことが知られている。腫瘍組織の細胞などにこのPD-L1が多く発現しており、腫瘍組織の周りで免疫抑制が起きている。PD-1阻害剤はT細胞のPD-1と腫瘍細胞などのPD-L1との結合を阻害することにより、免疫抑制を解除することで免疫賦活作用を示している。従って、このPD-1/PD-L1の相互作用を阻害する薬剤の評価系を作製することとした。具体的には図に示すように、PD-1およびPD-L1のFc融合組換えタンパクを作製し、ELISAの方法と同様に、プレートに固相化した組換えPD-1に対して、組換えPD-L1を試料(伝統医薬品・植物エキスなど)と同時に添加し、組換えPD-L1を認識する2次抗体の酵素反応を利用して組換えPD-1に結合している組換えPD-L1量を定量することで阻害活性を評価する系をさくせいすることとした。



(2) NFAT-RE-ルシフェラーゼレポーターアッセイ

T細胞活性化にかかわるNFAT-RE-ルシフェラーゼレポーターアッセイによるスクリーニングをおこなうこととした。HEK293細胞にNFAT結合領域を持つレポータープラスミドをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を指標として生薬・植物エキス(終濃度100 μ g/mL)の活性を評価した。

(3) 免疫チェックポイント分子の cell based assay によるスクリーニング

プロメガ社から販売されているアッセイキットを利用し、免疫チェックポイント分子の阻害活性を評価する。PD-1分子およびT細胞受容体を発現し、NFAT-RE-ルシフェラーゼレポータープラスミドを導入されたJurkat細胞とPD-L1分子およびT細胞受容体活性化分子を発現するCHO-K1細胞を用いて、*in vitro*でのT細胞受容体刺激とPD-1/PD-L1相互作用をルシフェラーゼ活性により阻害効果を評価できるアッセイ系を使って生薬抽出エキス約150種類をスクリーニングした。

(4) 加齢と免疫細胞の疲弊化に関するマウスを使った解析

月齢の異なるC57BL/6Jマウス(2, 5, 9, 16月齢)を用いて、脾臓を採取し、脾臓内の免疫細胞の組成をフローサイトメーターにより解析することによって、T細胞の発現するPD-1分子の割合、ナイーブT細胞とエフェクターメモリーT細胞の割合、制御性T細胞の割合の変化を解析した。

(5) スクリーニング用の伝統医薬品・植物エキスの準備

スクリーニングをおこなう伝統医薬品としては、日本全国で手に入り、製品化されて一般的に使用されており、比較的品质が揃っていることを理由に、まずは生薬エキスを第1候補として用意した。また、その他に連携研究者らによって採取・作製された奄美産植物と沖縄産植物の植物エキスライブラリーもスクリーニング候補として準備した。

4. 研究成果

(1) 免疫チェックポイント組換えタンパクの作製とアッセイ系の構築

PD-1およびPD-L1の細胞外ドメインのクローニングをおこない、マウスまたはラットのFcタグと融合させた分泌タンパクを遺伝子導入したHEK293細胞を用いて作製することができた。この分泌タンパクを利用してPD-1分子とPD-L1分子の相互作用を検出するアッセイ系を構築し、PD-1阻害剤であるPD-1に対する阻害抗体を利用して、その効果を評価しようと検討をおこなったところ、このアッセイ系ではPD-1にタグ付けされたFcとPD-L1にタグ付けされたFc、さらにポジティブコントロールのPD-1阻害抗体のFcなどがたくさん共存しており、検出系として酵素標識2次抗体を利用するがいろいろなところで交差反応が起こり、うまくポジティブコントロールを用いて濃度依存的な阻害効果を示すアッセイ系を確立することが困難であり、いくつか2次抗体を買い換えて検討をおこなったが上手く確立することができなかった。ポジティブコントロールによるアッセイ系の阻害効果を評価することができなかったが、2次抗体が結合していることが酵素反応で確認されているので、生薬エキス(終濃度100 μ g/mL)を加えて阻害活性の評価をおこなった。その結果、吸光度が55%ほどまで低下するものがいくつか存在したが、それ以上にあまり強い阻害効果を示す生薬エキスは確認されなかった。

(2) NFAT-RE-ルシフェラーゼレポーターアッセイによるスクリーニング

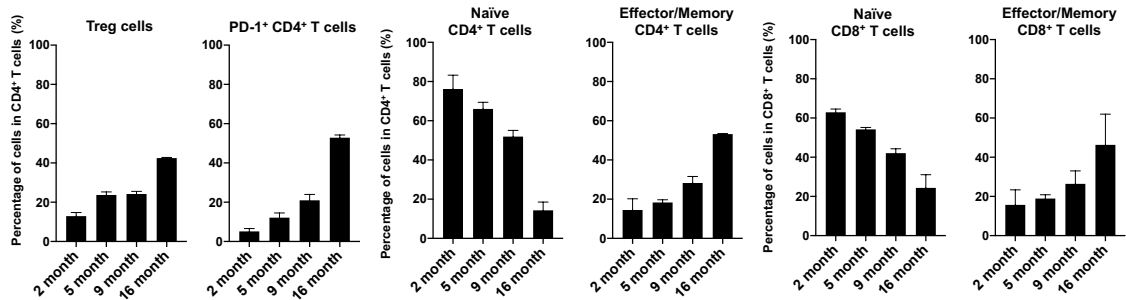
直接的なタンパク質間の阻害効果が上手く評価できなかったことから、T細胞の活性化を指標としたアッセイ系としてT細胞活性化に関わるNFATの結合領域をプロモーターに持つルシフェラーゼレポーターアッセイを、HEK293細胞に遺伝子導入することによりエキスのスクリーニングをおこなった。コヘンルーダ、ヒハツモドキ(果実)、オウゴン、カクコン、カンゾウ、アマチャ、オウヒ、サンズコンなどにルシフェラーゼ活性が検出され、それらはコントロールの5倍ほどのルシフェラーゼ活性を示したが、他のプロモーター活性を評価するルシフェラーゼアッセイでも活性が高く出る傾向があるエキスであったことから、ATPなどのルシフェラーゼ活性に直接影響を及ぼしている可能性も考えられた。

(3) 免疫チェックポイント分子の cell based assay によるスクリーニング

次にcell based assayを用いて、スクリーニングをおこなったところ、ポジティブコントロールとして使用したPD-1阻害抗体が濃度依存的に活性化を示した。その活性としてはコントロールの最大で4倍程度の活性を示した。一方で、生薬エキスに関しては、100 μ g/mLでは細胞毒性を示してしまうエキスもあり、活性が低下するものはたくさん存在したが、活性が1.5倍程度上昇するエキスとして、チクセツニンジンが最も高い活性を示した。残念ながら、3つのアッセイ系を総合的にみたところ、今回報告書に記載している生薬エキス関連では免疫チェックポイント阻害効果を強く示すエキスは見出せなかった。しかし、現在もPD-1/PD-L1の組換えタンパクのタグを違うものに変化させたアッセイ系をタグ選択的な2次抗体などの利用で構築させるとともに、まだ実施できていない奄美産および沖縄産植物エキスライブラリーのスクリーニングを継続的に続けていく予定である。

(4) 加齢と免疫細胞の疲弊化に関するマウスを使った解析

加齢と免疫疲弊の関係性を解析するため、月齢の異なるマウスから脾臓を採取し、脾臓中の免疫細胞組成をフローサイトメーターにより解析をおこなった。その結果、免疫抑制にかかわる制御性 T 細胞 (Treg) の割合と免疫疲弊に関わる PD-1 分子を発現する CD4⁺T 細胞の割合を調べたところ、図に示すように加齢とともに Treg の割合も PD-1 を発現する CD4⁺T 細胞の割合も増加する結果が得られた。また、ナイーブ T 細胞とエフェクターメモリー T 細胞の割合もナイーブ CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞ともに加齢とともに、ナイーブ T 細胞が減少し、エフェクターメモリー T 細胞が増加する結果が得られた。これらの結果は、加齢に伴って免疫機能が落ちることの裏付けとなる結果である。



(5) まとめ

本研究を通して、最新の抗体医薬品を置き換えるような同等なメカニズムを持つ伝統医薬品や天然由来成分は容易に発見することが困難であることが明らかとなった。しかし、最近では合成低分子化合物で免疫チェックポイント分子の阻害効果を持つ化合物も発見されてきていることから、根気強く探索することで発見することができる可能性もある。今回の研究期間では、コロナ渦という特殊な期間であり、大学での研究に従事する時間の短縮や、医学部で実施が難しい化学系の研究を実施してもらう共同研究者との連携が上手く取ることができなかったことから、大量なエキスを利用した生物活性の評価や成分分析、活性成分の分画などに進むことができなかった。しかし、今回の最後に示した研究データである加齢とともに増化する疲弊した免疫細胞を除去することで、若い時の免疫能力に近づけることができるのではないかとということが示唆された。直接的に免疫チェックポイント分子を阻害することは難しいかもしれないが、ここからの発展研究としては免疫疲弊した老化免疫細胞を除去するという観点で研究を進展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taniura Takahito, Iida Yuichi, Kotani Hitoshi, Ishitobi Kazunari, Tajima Yoshitsugu, Harada Mamoru	4. 巻 111
2. 論文標題 Immunogenic chemotherapy in two mouse colon cancer models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3527 ~ 3539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14624	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 Iida Yuichi, Yoshikawa Rintaro, Murata Akihiko, Kotani Hitoshi, Kazuki Yasuhiro, Oshimura Mitsuo, Matsuzaki Yumi, Harada Mamoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Local injection of CCL19-expressing mesenchymal stem cells augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 antibody by promoting infiltration of immune cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e000582 ~ e000582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-000582	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 Satoh Yusuke, Kotani Hitoshi, Iida Yuichi, Taniura Takahito, Notsu Yoshitomo, Harada Mamoru	4. 巻 111
2. 論文標題 Supplementation of L-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer chemoimmunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2248 ~ 2258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14490	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 Inao Touko, Kotani Hitoshi, Iida Yuichi, Kartika Irna Diyana, Okimoto Tamio, Tanino Ryosuke, Shiba Eiichi, Harada Mamoru	4. 巻 110
2. 論文標題 Different sensitivities of senescent breast cancer cells to immune cell mediated cytotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2690 ~ 2699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14116	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 Okimoto Tamio, Kotani Hitoshi, Iida Yuichi, Koyanagi Akira, Tanino Ryosuke, Tsubata Yukari, Isobe Takeshi, Harada Mamoru	4. 巻 111
2. 論文標題 Pemetrexed sensitizes human lung cancer cells to cytotoxic immune cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14401	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小谷仁司、飯田雄一、原田守
2. 発表標題 老化誘導剤アフィジコリンと老化細胞除去薬ABT-263による乳癌細胞に対する新しい組み合わせ治療
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Kotani, Yuichi Iida, Mamoru Harada
2. 発表標題 Identification of a candidate that suppresses the differentiation of naive helper T cells to regulatory T cells via screening of herbal crude drugs
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	矢作 忠弘 (YAHAGI TADAHIRO)		

6. 研究組織（つづき）

	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	三宅 克典 (MIYAKE KATSUNORI)		
研究協力者	片川 和明 (KATAKAWA KAZUAKI)		

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