

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17193

研究課題名(和文) ILC2をターゲットとした新規抑制化合物・天然物の同定

研究課題名(英文) Identification of novel inhibitory compounds targeting ILC2

研究代表者

加畑 宏樹 (Kabata, Hiroki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60528537

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)：2型自然リンパ球(ILC2)に対して抑制効果を有する新規候補物質を同定するため、既存薬スクリーニングを行い、高脂血症に対して用いられているスタチン製剤及びToll like receptor 7(TLR7)に対するアゴニスト(R848)が同定された。これらの薬剤を自然免疫型喘息モデルマウスに投与したところ、喘息病態が有意に改善し、ヒトILC2における抑制効果や抑制機序について明らかにした。今後これらの薬剤がアレルギー性疾患や好酸球性疾患におけるILC2をターゲットとした新しい治療薬となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型自然リンパ球(ILC2)は様々なアレルギー性疾患や好酸球性疾患の病態に関与していることが示唆されているが、これまでILC2をターゲットとした薬剤は存在しなかった。特に、ILC2はステロイド治療に対して抵抗性を示すことから、ステロイド以外の新規治療薬が期待されていた。今回、我々はスタチンやTLR7アゴニストが、ILC2が関与する喘息病態を改善させることを世界で初めて明らかにした。これらの薬剤はすでに臨床開発が行われているため、今後すみやかにILC2をターゲットとした新規治療薬として臨床で用いられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We screened existing drugs to identify new candidates with inhibitory effects against group 2 innate lymphoid cells (ILC2), and identified statins used for hyperlipidemia and an agonist against Toll like receptor 7 (TLR7), R848. When these drugs were administered to a mouse model of innate immunity-mediated asthma, the airway inflammation was significantly improved, and the inhibitory effect on human ILC2 and the mechanism of inhibition were clarified. It is expected that these agents will become new therapeutic agents targeting ILC2s in allergic and eosinophilic diseases.

研究分野：アレルギー

キーワード：ILC2 新規治療薬

1. 研究開始当初の背景

2010年に同定された2型自然リンパ球(ILC2)はT細胞やB細胞のように抗原を認識する受容体を発現しないが、IL-33やIL-25などの刺激によって多量のIL-5やIL-13を産生し、抗原非特異的な2型炎症を誘導する細胞である。現在、ILC2は気管支喘息や様々なアレルギー性疾患における好酸球性炎症に寄与していると考えられている。気管支喘息の治療の第一選択薬は吸入ステロイド薬であるが、高用量の吸入ステロイド薬を用いても炎症がコントロールできない重症喘息患者が喘息患者の約5~10%に存在し、喘息治療に残された大きな課題として世界的にその検討が進められている。我々はILC2がIL-33及びTSLP存在下でステロイド抵抗性の好酸球性炎症を誘導することを発見し、ILC2を抑制することが重症喘息の治療につながる可能性を以前報告した(Kabata H, et al. Nat Commun, 4: 2675, 2013)。さらに、ILC2を抑制するサイトカインについて検討を行い、インターフェロンやIL-27がILC2の活性化を抑制することを報告した(Moro K, Kabata H, et al. Nat Immunology, 17: 76-86, 2016)。現在までに、様々なサイトカインや脂質メディエーターなどがILC2の活性化や抑制に関与し、その機序についても次第に明らかになってきている(Kabata H, et al. Immunol Rev, 286: 37-52, 2018、図1)。しかしながら、依然として臨床でILC2を標的とした薬剤は存在せず、ステロイド薬に代わる新規抑制物質の同定が期待されている。

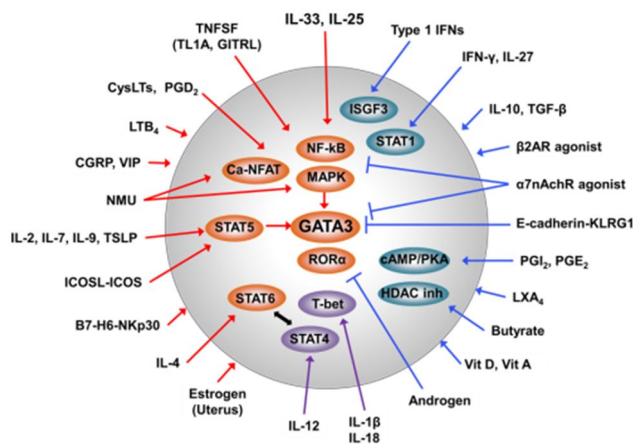


図1. ILC2の活性化や抑制に関する因子

2. 研究の目的

本研究の目的は、ILC2を抑制する新規化合物を同定し、抑制機序を調べることにより、気管支喘息やアレルギー性疾患に対する新しい治療候補物質を発見することである。近年、既に臨床で用いられている薬剤の中から本来の薬効とは異なる作用を見つけ、別の疾患の治療薬としての適応を探索する既存薬スクリーニング(Drug repositioning, DR)研究が注目を集めている。既に臨床で用いられている薬剤ゆえに新規薬剤開発にかかる時間や費用の節約および早い段階で臨床応用できるメリットがある。そのため、今回、既存薬ライブラリーの中からILC2に対する抑制作用を有する物質を同定し、早期の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ILC2に対する抑制薬のスクリーニング

マウスの腸間膜リンパ組織よりフローサイトメトリーを用いてCD45(+) Lineage marker(-)Sca-1(+)c-kit(+)細胞(ILC2)を単離し、96wellプレートを用いてIL-2(10ng/ml)の刺激下で培養した。培養したILC2を5000個/wellずつ96wellプレートに入れ、IL-33(10ng/ml)及び既存薬(1μM及び5μM)の存在下で96時間培養し、細胞増殖とサイトカイン産生を評価することで、ILC2に対して抑制効果を示す化合物のスクリーニングを行った。

(2) 喘息モデルマウスにおける抑制効果の検討

スクリーニングで抑制作用が見られた化合物を用いて、喘息モデルマウスにおける抑制効果を検討した。特にILC2が関与しているIL-33やアルテルナリアによる自然免疫を介したモデルでの抑制効果を検討した。BALF及び肺組織における好酸球数やILC2数、BALF中のサイトカイン、肺の病理学的変化(HE染色およびPAS染色)などを測定した。

(3) ヒトILC2に対する抑制効果の検討

同定された化合物に関して、ヒトILC2を用いて抑制濃度の検討や細胞増殖、細胞死、サイトカインの産生などに関して検討を行った。

(4) ILC2に対する抑制機序の解明

同定された化合物や天然物がどのような機序でILC2を抑制するかについて、各種阻害薬やRNA-seq解析によって抑制機序の検討を行った。

4. 研究成果

(1) アトロバスタチン

HMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)はコレステロール合成を阻害するため脂質異常症に対し

て用いられている既存薬である。今回、我々は既存薬スクリーニングによってアトロバスタチンが ILC2 を抑制することを発見した。IL-33 やアルテルナリアを用いて 2 型気道炎症を誘導したマウスに、スタチンを投与すると肺における好酸球数や ILC2 数、2 型サイトカイン産生が有意に低下した。また、ヒト ILC2 を用いた実験においてもアトロバスタチンが濃度依存的に抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、アトロバスタチンが ILC2 を抑制する機序を調べたところ、メバロン酸の合成低下によって ILC2 の活性化を抑制していることが判明した。本研究に関して、第 61 回、第 62 回日本呼吸器学会学術講演会にて発表し、学術部門賞の優秀賞に表彰された。

(2) Toll like receptor 7 (TLR7) agonist (R848)

TLR7 agonist である R848 は免疫調整作用を有しており、近年アレルギー性疾患に対する臨床試験が行われている。既存薬スクリーニングでは ILC2 に対する直接抑制効果は認められなかったが、IL-33 による好酸球性気道炎症モデルに R848 を投与すると肺における好酸球数や ILC2 数、2 型サイトカイン産生を著明に抑制することが判明した。そこで、R848 の 2 型炎症の抑制機序について調べたところ、IL-33 によって誘導される間質マクロファージが R848 の標的となっていることが判明した。さらに、R848 は間質マクロファージにおける *Fizz1*, *Ym1*, *Ccl17*, *Ccl24* の発現を低下させ、マクロファージのフェノタイプを変化させるとともに ILC2 の抑制因子である IL-27 の産生を誘導することが明らかとなった(図 2、3)。

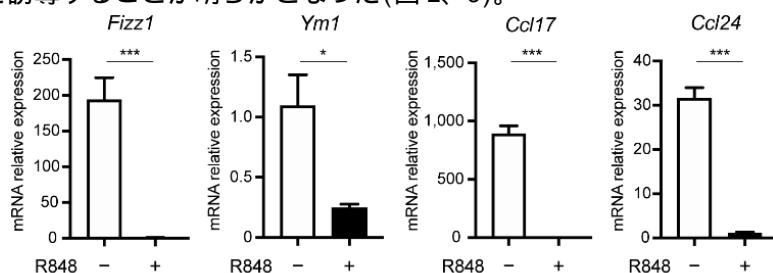


図 2. R848 による間質マクロファージの RNA の変化

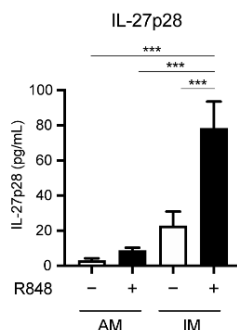


図 3. 肺胞マクロファージ (AM) 及び間質マクロファージ (IM) からの IL-27 産生

間質マクロファージと ILC2 を共培養したところ、R848 非刺激下では ILC2 に対する抑制効果は認められなかったが、R848 刺激下において ILC2 の増殖及び 2 型サイトカイン産生を有意に低下させた(図 4)。

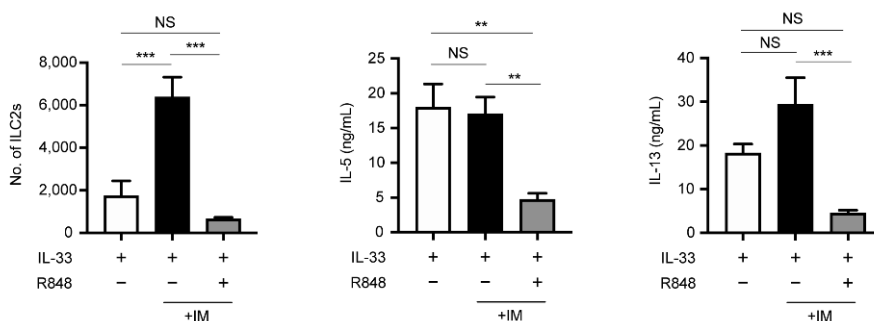


図 4. 間質マクロファージ (IM) と ILC2 の共培養

さらに、IL-27 受容体のノックアウトマウスである *WSX-1^{-/-}* マウスにおいて、R848 による ILC2 の抑制効果が消失することから、R848 の ILC2 への抑制効果は IL-27 に依存していることが示唆された(図 5)。

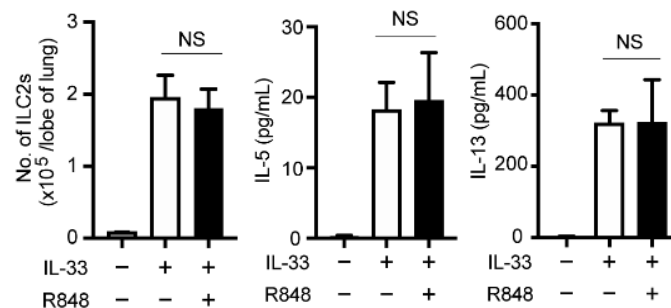


図5. WSX-1-/-マウスに対する IL-33 及び R848 投与実験

以上の結果から、IL-33 の投与で生体内に誘導された間質マクロファージは R848 の刺激によりフェノタイプを変化させ、IL-27 を産生することで ILC2 を抑制することが示唆された。本研究成果は、第 61 回日本呼吸器学会学術講演会、第 70 回アレルギー学会学術大会にて発表し、アメリカ呼吸器学会の機関紙である *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 誌に報告した。

(3) 今後の臨床応用にむけて

今回、ILC2 及び 2 型免疫応答を抑制する新規化合物として、アトルバスタチン及び R848 が同定された。スタチン製剤の喘息に対する臨床効果に関しては、これまでも複数の臨床試験が行われてきたが、一定の見解が得られていなかった。そこで、我々はスタチン製剤の喘息に対する有効性を検証するためにシステマティックレビュー及びメタ解析を行った。その結果、スタチン製剤が喘息のコントロールを改善させ、救急外来受診を減らす可能性が示唆された(*Journal of Asthma*)。そのため、今後これらの薬剤を用いて、ILC2 をターゲットとしたアレルギー性疾患に対する前向き臨床試験の実施が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Irie Misato, Sasahara Kotaro, Artis David, Kabata Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Current overview of the role of neuropeptides in ILC2s and future directions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	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） 10.1016/j.alit.2022.03.002	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 該当する

1. 著者名 Okuzumi Shinichi, Miyata Jun, Kabata Hiroki, Mochimaru Takao, Kagawa Shizuko, Masaki Katsunori, Irie Misato, Morita Hideaki, Fukunaga Koichi	4. 巻 65
2. 論文標題 TLR7 Agonist Suppresses Group 2 Innate Lymphoid Cell-mediated Inflammation via IL-27-Producing Interstitial Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 309～318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2021-00420C	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 該当する

1. 著者名 Sunata Keeya, Kabata Hiroki, Kuno Toshiki, Takagi Hisato, So Matsuo, Masaki Katsunori, Fukunaga Koichi	4. 巻 59
2. 論文標題 The effect of statins for asthma. A systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asthma	6. 最初と最後の頁 801～810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02770903.2021.1879850	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂田 啓英也、加畑 宏樹、鎌谷 高志、入江 美聡、正木 克宜、宮田 純、福永 興壱
2. 発表標題 スタチンによるILC2を介した2型気道炎症の抑制機序の解明
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加畑 宏樹, 奥隅 真一, 宮田 純, 福永 興吉
2. 発表標題 自然免疫ネットワークによるアレルギーの病態と制御
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加畑宏樹
2. 発表標題 気管支喘息におけるIL-4とIL-13の役割を再考する
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥隅 真一, 宮田 純, 加畑 宏樹, 正木 克宜, 加川 志津子, 田野崎 貴絵, 入江 美聡, 秋山 勇人, 西江 美幸, 浅岡 雅人, 砂田 啓英也, 笹原 広太郎, 富保 紗希, 福永 興吉
2. 発表標題 TLR7を介したIL-33誘導性自然免疫型喘息の抑制効果における間質マクロファージの役割
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥隅 真一, 宮田 純, 加畑 宏樹, 加川 志津子, 田野崎 貴絵, 桑江 美聡, 秋山 勇人, 西江 美幸, 浅岡 雅人, 砂田 啓英也, 笹原 広太郎, 富保 紗希, 福永 興吉
2. 発表標題 TLR7アゴニスト(R848)による好酸球性気道炎症抑制機序の解明
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥隅 真一, 宮田 純, 加畑 宏樹, 加川 志津子, 田野崎 貴絵, 桑江 美聡, 秋山 勇人, 西江 美幸, 浅岡 雅人, 砂田 啓英也, 笹原 広太郎, 富保 紗希, 福永 興孝
2. 発表標題 気管支喘息に対するスタチンの有効性の検証
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
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