

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591156
 研究課題名（和文）新規に発見されたインターロイキン 18 阻害剤等によるアレルギー免疫病態解析治療開発
 研究課題名（英文）Development of therapy for allergy and immunological disorders using newly found interleukin-18 inhibitors
 研究代表者
 加藤 善一郎（KATO ZENICHIRO）
 岐阜大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：90303502

研究成果の概要（和文）：IL-18 リガンド・レセプター複合体立体構造解析を行い、構造学的基盤を解明し、構造に基づいた低分子阻害剤スクリーニングの基礎的検討及びスクリーニングアッセイシステムの確立を行った。新規阻害分子の細胞機能解析及びタンパク質相互作用解析、各種免疫細胞を用いた細胞アッセイにて機能分析を行い、その活性の分子メカニズムを特定、候補薬剤分子を対象として、ハイスループット分子間相互作用解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Structural determination of the complex between interleukin-18 ligand and the receptor was successfully performed. The structural basis of the receptor activation was analyzed and the screening system using a virtual ligand screening method with the determined structure was established. Using the newly found inhibitors, analyses of cellular functions, protein-protein interactions, and immunological cell reactions were performed and the molecular mechanism was determined. The obtained candidate molecules were assayed by high-throughput system for interaction analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系、臨床医学・小児科学

キーワード：立体構造、IL-18、創薬

1. 研究開始当初の背景

発見した IL-18 阻害剤を用いた臨床応用研究へ向けた、ヒト由来細胞株を用いたサイトカイン抑制・LPS を使用したマウス肝炎モデルにおいては、阻害効果の確認を行っており、in vivo での阻害効果が示唆されている。さら

により詳細な作用メカニズム解析と用量設定を行う必要性があり、また、より一般的薬剤としての開発を、他の疾患モデル(喘息モデル、アトピーモデル、関節リウマチモデル等)にて検証することが重要と判断された。これまでに、我々自身により確立した阻害タンパ

ク IL-18BP 及びヒト型 IL18 阻害抗体との阻害効果等の比較を行うことが可能となっている。

2. 研究の目的

すでに発見した新規阻害分子等を用いた臨床応用研究として、IL-18 研究において確立した構造解析・薬剤探索システムを応用して、他のサイトカイン(特に IL-18 と同じ β -trefoil 構造をもつサイトカイン)における立体構造基盤薬剤探索を行い、免疫細胞上での機能解析及びタンパク質相互作用解析を経て、2 次スクリーニングを行い、自己免疫・自己炎症疾患等への 応用可能な分子を発見する。

3. 研究の方法

β -trefoil 型サイトカインにおけるレセプタータンパク発現精製系の確立と構造情報の収集・レセプタータンパク複合体の構造解析を行う ます、ターゲットとなるレセプター群の解析を行う。その際、両者の非ラベル体及び各種ラベル体を種々の組み合わせで混合し複合体を形成させた後、分子間 NMR 情報を Transferred NOE などの手法を用いて収集し、原子間距離情報 (NOE)・原子の結合角情報(coupling 定数)を用いた 複合体構造の計算を行う。同時に、NMR を用いた chemical shift perturbation 法や表面プラズモン現象を応用した結合実験を行い、結合様式の詳細を解明する。

安定同位体ラベルしたタンパクを作成し、タンパクを構成する N 末から C 末までのアミノ酸の主鎖の各原子を NMR スペクトル上にアサインする。タンパクポリペプチド主鎖のアサインが終了後、chemical shift index 法などを用いた二次構造の解析に移る。ついで側鎖の原子を含めたタンパク構成全原子のアサインを行う。その後原子間距離情報 (NOE)・原子の結合角情報(coupling 定数)

を用いた立体構造計算及び新しい技術である residual dipolar coupling を用いた精密化を行う。

4. 研究成果

新規阻害分子の細胞機能解析及びタンパク質相互作用解析 すでに得られている阻害分子をもとにして、各種免疫細胞を用いた細胞アッセイにて機能分析を行い、その活性の分子メカニズムを特定、候補薬剤分子を対象として、現有するハイスループット分子間相互作用解析装置(蛍光相互作用解析装置及び表面プラズモン解析装置等)を用いた実際のスクリーニングを行った。

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 15 件)

- ①Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N In Vitro Analysis of the Functional Effects of an NLRP3 G809S Variant with the co-Existence of MEFV Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome J Clin Immunol 33, 2013, 325-34 (査読あり)
- ②Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling Mol Immunol 52, 2012, 108-116 (査読あり)
- ③Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N Characterization of NLRP3 variants in Japanese

- cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol* 32, 2012, 221-229 (査読あり)
- ④Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One* 7, 2012, e38423 (査読あり)
- ⑤Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 129, 2012, 578-80. (査読あり)
- ⑥Omoya K, Naiki Y, Kato Z, Yoshioka S, Uchida Y, Taga T, Aoki Y, Deguchi H, Kondo N: Sweet's syndrome in a neonate having non-B54 types of HLA. *World J Pediatr.* 8, 181-184, 2012 (査読あり)
- ⑦Funato M, Kaneko H, Ohkusu K, Sasai H, Kubota K, Ohnishi H, Kato Z, Fukao T, Kondo N: Refractory Chronic Pleurisy Caused by *Helicobacter equorum*-like bacterium in a Patient with X-linked Agammaglobulinemia. *J Clin Microbiol.* 49, 3432-3435, 2011 (査読あり)
- ⑧Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T: ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Brit J Haematol.* 153, 675-676, 2011 (査読あり)
- ⑨Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N: Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy.* 66, 985-986, 2011 (査読あり)
- ⑩An Y, Ohnishi H, Matsui E, Funato M, Kato Z, Teramoto T, Kaneko H, Kimura T, Kubota K, Kasahara K, Kondo N: Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med.* 27, 795-801, 2011 (査読あり)
- ⑪Kato Z, Manabe T, Teramoto T, Kondo N: Adenovirus infection mimics the cerebellitis caused by rotavirus infection. *Eur J Pediatr.* 170, 405-406, 2011 (査読あり)
- ⑫Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, Kubota T, Oka M, Kato Z, Hamano S, Hirabayashi S, Kikuchi M, Barkovich AJ: Clinical and radiological features of rotavirus cerebellitis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 31, 1591-1595, 2010 (査読あり)
- ⑬Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign.* 4, 123-128, 2010 (査読あり)
- ⑭Stern JN, Keskin DB, Kato Z, Waldner H, Schallenberg S, Anderson A, von Boehmer H, Kretschmer K, Strominger JL: Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 107, 17280-17285, 2010 (査読あり)

- ⑮ Kato Z, Stern JN, Nakamura HK, Miyashita N, Kuwata K, Kondo N: The autoimmune TCR-Ob. 2F3 can bind to MBP85-99/HLA-DR2 having an unconventional mode as in TCR-Ob.1A12. Mol Immunol. 48, 314-320, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kato Z : Proteomics analysis for genetic polymorphisms associated with allergy. Joint Congress of Asia Pacific Association of Pediatric Allergy , Respirology and Immunology 2011 and 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. Fukuoka, Japan, 2011
- ② Matsui E, Kimata K, Ohnishi H, Kato Z, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Symposium : Prevention for onset and exacerbation of bronchial asthma on the basis of tailor-made prediction. The 21th congress of Interasma Japan/North Asia. Gifu, Japan, 2011
- ③ Kaneko H, Ohnishi H, Morita H, Yamamoto T, Kubota K, Teramoto T, Kato Z, Matsui E, Kato H, Nakano T, Kondo N : Development of enzymatically digested peptides for immunomodulation therapy in patients with cow's milk allergy. Joint Congress of Asia Pacific Association of Pediatric Allergy , Respirology and Immunology 2011 and 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. Fukuoka, Japan, 2011
- ④ Hori T, Ohnishi H, Tsubouchi K, Kubota K, Teramoto T, Kato Z, Hirose Y, Kaneko H, Fukao T, Ohara O, Seishima M, Kondo N :

In vitro analysis of a case of chronic mucocutaneous candidiasis combined with atrophic thyroiditis and autoimmune hepatitis.

Joint Congress of Asia Pacific Association of Pediatric Allergy , Respirology and Immunology 2011 and 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. Fukuoka, Japan, 2011

- ⑤ Yamamoto T, Teramoto T, Ohnishi H, Kuwabara H, Usui S, Morita H, Kato Z, Kaneko H, Ohara O, Kondo N : A case report of an infant with Haemophilus influenzae meningitis with severe eczema, high serum IgE, and hypoproteinemia. Joint Congress of Asia Pacific Association of Pediatric Allergy , Respirology and Immunology 2011 and 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. Fukuoka, Japan, 2011
- ⑥ Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Nada M, Kubota K, Shirakawa M, Kondo N: Symposium: Structural basis for the innate immune deficiency syndrome. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology. Singapore, 2010
- ⑦ Kaneko H, Morita H, Ohnishi H, Kato Z, Matsui E, Kondo N: Expression and purification of recombinant soybean protein P34 and its clinical application. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology. Singapore, 2010
- ⑧ Ohnishi H, An Y, Matsui E, Kato Z, Kaneko H, Kondo N : The gene polymorphisms of MyD88 adaptor like protein (Mal) are associated with susceptibility to allergic diseases in Japanese children. The 20th congress of Interasma Japan/North Asia. Tokyo, Japan, 2010

- ⑨Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kondo N, Shirakawa M: Structural basis for the interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. World wide magnetic resonance conference. Firenze, Italy, 2010
- ⑩Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Funasaka T, Wong R.W, Shirakawa M, Kondo N: A conserved interaction mode between MyD88 and distinct membranesorting adaptors in TLR4 and IL-18 signaling. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan, 2010
- ⑪Kimura T, Kato Z, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Kondo N: Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: A potent therapeutic molecule for allergy. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan, 2010
- ⑫Ohnishi H, Teramoto T, Kato Z, Kaneko H, Nishikomori R, Kondo N: The LPS induced enhancement of IL-1 β and IL-18 production is a useful tool for diagnosis of familial cold inflammatory syndrome (FCAS). Autoinflammation. Amsterdam, Netherlands, 2010
- ⑬Teramoto T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N: A case report of atypical mild chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome showing the phenotype of mixed connective tissue disease. Autoinflammation. Amsterdam, Netherlands, 2010

〔図書〕（計3件）

- ①加藤善一郎,大西秀典,近藤直実アレルギー疾患の免疫療法と分子標的療法 分子標的治療とその機序 診断と治療社 2012, 21-26
- ②加藤善一郎,大西秀典,近藤直実 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患 自

己炎症性疾患 総論 診断と治療社 2012, 62-66

- ③加藤善一郎,大西秀典,近藤直実自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患 ヒトパピローマウイルス易感染症 診断と治療社 2012, 115-116

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 善一郎 (KATO ZENICHIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90303502

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし