

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2014

課題番号：25713058

研究課題名(和文)ブタクサ花粉アレルギーモデルを用いたHLA機能制御分子の探索

研究課題名(英文)The search for HLA inhibitor using short ragweed allergy mouse model.

研究代表者

河越 龍方(Kawagoe, Tatsukata)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20564800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はHLA機能を制御できる新規薬物の開発を目的としている。HLA機能を抑制できる低分子化合物を、新規スクリーニング法にて探索した。HLA-DQ6およびDQ8に対してin silico drug discovery法にて探索を行った。結合性の高い化合物を市販化合物データベースにある約600万化合物から絞り込みを行い、親和性の高い化合物が各HLAとともに49種類ずつ判明した。生体内で実際にHLA機能抑制能を示すかどうかHLA-DQ6およびDQ8トランスジェニックマウスを用いたブタクサ花粉アレルギーモデルを用いて研究を引き続き行う。HLAをターゲットとしたアレルギー治療法の開発に努めていく。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to search the low molecular compounds that bind to HLA and inhibit T cell mediated allergic reaction. Using in silico screening methods, we determined high affinity chemical compounds to HLA-DQ6 and DQ8 from 6 million chemical libraries. We identified 49 compounds in each HLA. By some technical problems in the experiments, the progress is behind the schedule. We are still creating transgenic mice expressing HLA-DQ6 (HLA-DQA1*0103, HLA-DQB1*0601) and DQ8 (HLA-DQA1*0301, HLA-DQB1*0302) genes in H2 class II knockout mice. We will immunize these mice with short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) extracts or known epitopes, and demonstrate the identified chemical compounds inhibit T cell reaction. The humanized mouse model of allergy could be the screening model of HLA inhibitor. We will continuously develop a novel treatment of allergy.

研究分野：眼科学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

我が国において花粉症などによるアレルギー疾患は、国民病といわれるほど増加している。症状を軽減する様な方法で治療されているが、根本的な治療法は現在のところ存在しない。難治性アレルギー疾患に対して新規の治療薬の開発が求められている。

HLA(Human Leucocyte Antigen:ヒト白血球型抗原)はヒトにおけるMHC(Major Histocompatibility Complex)である。MHCは他の多くの脊椎動物において存在する分子で、マウスにおいてはH-2(Histocompatibility-2)と呼ばれる。MHC分子は大きくクラスⅠとクラスⅡ分子に分けられ、クラスⅠ分子は内因性ペプチドを、クラスⅡ分子は外来性ペプチドと結合して、T細胞へ抗原提示をする。MHCは病原体やがん細胞の排除に働くが、一方様々な疾患を引き起こすとも考えられている。MHCは個体によって非常に多型性に富むことが知られている。ある特定のMHC分子を保有することによって、ある特定の疾患に罹りやすい或いは罹りにくいということが統計学上様々な疾患において明らかとなっている。

花粉症などのアレルギーは、その原因として遺伝的素因が大きく関わることが知られている。アレルギー性疾患は多数の遺伝子が関わる多因子疾患であるが、特にHLAとの関連は古くから知られている(Zwollo P et al. J Allergy Clin Immunol. 1989;83(1):45-54.)(Marsh DG et al. J Exp Med. 1982;155(5):1439-51.1452-63.)。以前、ヒトのHLAクラスⅡ分子である、HLA-DQ6(HLA-DQA1*0103, HLA-DQB1*0601)およびHLA-DQ8(HLA-DQA1*0301, HLA-DQB1*0302)をマウス体内で強制発現させたトランスジェニックマウス(背景にマウス内因性MHCクラスⅡを欠損させている)を用いた実験がなされている。これらトランスジェニックマウスでは、ブタクサ花粉抗原に対する強いT細胞応答が認められることが示されている(Chapoval SP et al. J Immunol. 1998;161(4):2032-7.)。さらにこの実験では、HLA-DQ6およびHLA-DQ8を強制発現させずに、マウスクラスⅡのみ欠損させたコントロールマウスにおいては、その反応がまったく見られないことも示されている。すなわち、ブタクサ花粉は、体内でペプチドに分解されHLA-DQ6あるいはHLA-DQ8によりT細胞に強く提示されていることが分かる。その後実際に、ブタクサによる気管支喘息をHLA-DQ6およびHLA-DQ8トランスジェニックマウスに誘導させると、肺組織へ著明に浸潤する好酸球浸潤と、気管支肺胞洗浄液中のIL-5濃度上昇が引き起こされることも報告されている(Chapoval SP et al. J Clin Invest. 1999;103(12):1707-17.)。

HLAによる花粉抗原ペプチドのT細胞への抗原提示を特異的に阻害することができ

ば、新規の効率的な治療法となりうると期待される。しかし今まで、適切な薬物スクリーニング方法が無かったため、このような試みは行われてこなかった。

2. 研究の目的

花粉症や気管支喘息などのⅠ型アレルギーでは、抗原とIgEの複合体がマスト細胞や好塩基球などのIgE受容体に作用したのちヒスタミン・セロトニン・ロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出される。これらが血管拡張作用などの生理活性を持っており、アレルギー症状を引き起こす。今日主流の抗アレルギー薬である抗ヒスタミン薬は、ヒスタミンの受容体H1受容体の作用を抑制することでアレルギー症状を抑制する。しかし、ヒスタミンはアレルギーカスケードの下流に位置するため、そこを阻害するだけではアレルギー抑制効果には限界がある。また、ステロイド薬には強いアレルギー抑制作用があるが、やはり同様にアレルギー反応が起こった後にその反応を抑制するという点に変わりはない。抗原ペプチドHLA複合体のT細胞への抗原提示が抑制できれば、カスケードのスタート地点をブロックするため、アレルギー反応を最初から働かなくすることができる可能性がある。

しかしこれまでに、大規模化合物ライブラリーを対象としたHLA機能阻害in silicoスクリーニングにおける結果は発表されておらず、また動物モデルを用いたHLA機能阻害薬に関する報告もなされていない。

最近になり、疾病と密接に係る標的タンパク質の立体構造に基づき、標的分子の機能を制御できる化合物を、コンピューターを活用して探索する方法、いわゆるin silico drug discovery法が、創薬開発に用いられるようになってきた。これら新たなスクリーニング法を用いた新規薬物の探索および臨床応用が求められている。

3. 研究の方法

研究当初、研究内容により3段階に分けて目標を置いた。第1段階はHLA機能抑制低分子化合物をin silico解析により特定(1次スクリーニング)。第2段階はブタクサ花粉感作マウスの脾臓細胞を用いて、先の化合物が、実際の細胞においても抑制作用を示すかの検討(2次スクリーニング)。第3段階はブタクサ花粉によるアレルギー性結膜炎および気管支喘息モデルマウスを作製し、第2段階で得られた化合物が、実際の生体内においても抑制作用があるかを検討することとした。

本研究は、この分野の専門家である東海大学医学部・平山令明教授の協力により行った。平山らの開発したアルゴリズムおよびデータベースを活用して、HLA-DQ6およびHLA-DQ8分子の機能を効率的に制御できる低分子化合物を探索した。

実際に生体内でブタクサ花粉によるアレルギー反応を抑制するかを調べるために既存のHLA-DQ6あるいはHLA-DQ8を譲り受けて実験を進めていく予定であった。

4. 研究成果

研究の土台となる一次スクリーニングとなる新規化合物の探索を完遂することができた。in silico drug discovery法にて、市販されている約600万化合物から、HLA結合化合物を抽出した。PDB code:2NNAの構造を採用(Henderson KN et al. Immunity.2007(1):23-34.)して、対象HLAとアミノ酸相同性の高いHLAのX線構造の探索を行った。続いてalpha site finder機能を用いて低分子結合部位の予測を行い、結合予測部位に結合する低分子のin silico探索を行った。Alpha Site Filter法によるpre-screening (Muta H et al. J Comput Chem. 2010;31(11):2225-32.)を行い可能性の高い化合物の抽出を行った後、ASEDockを用いたdocking計算(Goto J et al. J Chem Inf Model.2008;48(3):583-90. , GBVI/WSA_dG (Corbeil CR et al. J Comput Aided Mol Des.2012;26(6):775-86.)を行い、これによりさらに結合する可能性の高い化合物を絞り込んだ。その結果、HLA-DQ8およびHLA-DQ6に結合親和性の高い化合物がそれぞれに関して、49種類ずつ判明した。

二次スクリーニングとして生体内で実際にHLA機能抑制能を示すかどうかHLA-DQ6およびHLA-DQ8トランスジェニックマウスを用いてスクリーニングをしていく予定であった。当初は既存のマウス(Chapoval SP et al. J Immunol. 1998;161(4):2032-7.)を譲り受けて実験を進めていく予定であった。しかしこれらマウスは繁殖が難しく実験に使える量のマウスが育成しなかった。そこで現在、新規HLA-DQ6およびHLA-DQ8のHLAクラストランスジェニックマウス(マウスMHCクラス欠損した遺伝的バックグラウンド)の作製をおこなっている。このことにより、研究に遅れが出ている。今後速やかに新規これらHLAクラストランスジェニックマウスを作製し研究を続けていく。MHCによる抗原提示能を、ブタクサ花粉免疫後の脾臓細胞を用いて、³H標識チミジンの取り込みによるT細胞増殖試験、およびIL-4のELISpotアッセイによってスクリーニングしていく。その後、モデルマウスを用いた候補低分子化合物の生体内薬物効果の検討を行っていく。ブタクサ花粉によるアレルギー性結膜炎および気管支喘息を、HLA-DQ6およびHLA-DQ8トランスジェニックマウスにおいて誘導させる。その際上記スクリーニングにより同定した低分子化合物をマウスに投与し、実際の生体内においてもアレルギー反応が抑制されるかを検討していく。

これまでに、大規模化合物ライブラリーを対象としたHLA機能阻害in silicoスクリーニ

ングにおける結果は発表されておらず、また動物モデルを用いたHLA機能阻害薬に関する報告もなされていない。我々の研究がHLA機能阻害薬開発の端緒となりうる。また、花粉症モデルでその有用性が示せた後は、他のHLA過剰発現による疾患モデルマウスを用いて、本スクリーニング法を様々な疾患に応用拡大していくことができると考えられる。

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2件)

Isogai H, Miyadera H, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Tokunaga K, Hirayama N., In Silico Risk Assessment of HLA-A*02:06-Associated Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis Caused by Cold Medicine Ingredients.: J Toxicol. 2013;514068.

Amari S, Kataoka R, Ikegami T, Hirayama N., HLA-Modeler: Automated Homology Modeling of Human Leukocyte Antigens. Int J Med Chem. 2013;690513.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

河越 龍方(KAWAGOE, Tatsukata)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号:20564800

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

平山 令明 (HIRAYAMA, Noriaki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70238393