

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26305004

研究課題名(和文) アユルベータ医薬の機能に基づくアレルギー疾患治療戦略

研究課題名(英文) Strategy for allergic diseases treatment based on the function of ayurvedic medicines

研究代表者

福井 裕行 (FUKUI, Hiroyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任教授

研究者番号：90112052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：Tephresia purpureaから有効成分として新規ベンゾフラン化合物 4-methoxybenzofuran-5-carboxamide (HMBC)を同定した。MBCAはPKC δ の活性化を抑制しH1R遺伝子発現を抑制した。MBCAの異性体はMBCAよりも強いH1R遺伝子発現抑制活性を示した。アレルギーモデルラットにおいて、MBCAは鼻粘膜のH1R遺伝子や、IL-4、IL-5などのTh2サイトカイン遺伝子発現抑制を介して鼻症状を改善した。MBCAはIL-33遺伝子発現を抑制することから、アレルギー性鼻炎の急性症状だけでなく慢性症状も改善できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A novel benzofuran compound 4-methoxybenzofuran-5-carboxamide (HMBC) was identified as an active ingredient from anti-allergic ayurvedic medicine Tephresia purpurea. MBCA suppressed H1R gene expression through suppression of PKC δ activation. In addition, MBCA isomer showed stronger H1R gene expression inhibitory activity than MBCA. In allergy model rats, it was found that MBCA ameliorates nasal symptoms through suppressing expression of H1R gene and Th2 cytokine gene such as IL-4, IL-5 of nasal mucosa. Furthermore, since MBCA suppresses IL-33 gene expression, it is suggested that not only acute symptoms of allergic rhinitis but also chronic symptoms may be improved by MBCA.

研究分野：薬理学

キーワード：花粉症 アレルギー性鼻炎 アレルギー疾患 ヒスタミン 天然物医薬 疾患感受性遺伝子 細胞内シグナル PKC

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の主要治療薬は抗ヒスタミン薬であるが、十分な症状改善は得られない。ステロイドとの併用療法が主流となりつつあるが、病理機構に基づいた治療法とは言えない。

申請者は、ヒスタミンH₁ 受容体 (H1R) 刺激が、アレルギー疾患感受性遺伝子であることを明らかにした (Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2010) (図1A)。H1R 刺激によるH1R 遺伝子発現亢進は、PKCδ 活性化により引き起こされること (J Pharmacol Sci, 2007 (JPS 論文賞), J Biol Chem, 2011, Scientific Reports, 2012) (図 2)、及び、PKCδ 活性化は、抗ヒスタミン薬、マーキアイン、及び、ケルセチンにより抑制されることを明らかにした。しかし、PKCδ の抑制は、アレルギー性鼻炎モデルラットの症状を50%しか改善しないことが明らかとなった (図 1 B)。PKCδ の抑制では改善されない50%の症状について、NFAT シグナルの関与を明らかにした。NFAT 抑制薬として、阿波晩茶からピロガロールを同定した。そして、ピロガロールと抗ヒスタミン薬の併用投与により、症状の90%が改善された (図1B)。

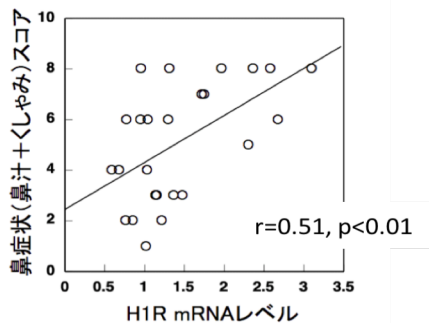


図1A. 花粉症患者ボランティアの鼻症状(鼻汁+くしゃみ)のスコアと鼻粘膜ヒスタミン H₁ 受容体(H1R)mRNA

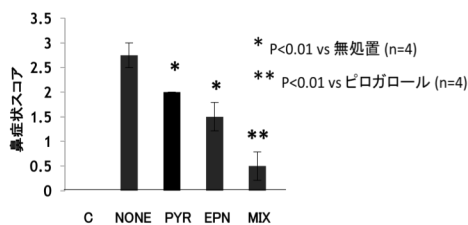


図1B. アレルギー性鼻炎モデルラットに対するピロガロール (PYR)、抗ヒスタミン薬 (EPN)、及び、併用投与 (MIX) による高度症状改善. C: コントロール、NONE: 無処置(鼻炎誘発)

以上の研究結果から、PKCδ 抑制とNFAT 抑制薬の併用投与により、アレルギー疾患の高度な症状改善を得るための治療戦略を確立できる可能性が考えられた。

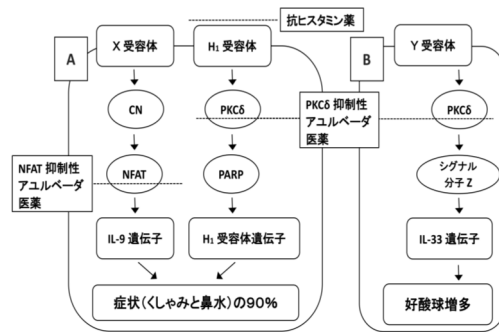


図2. A: アレルギー性鼻炎のくしゃみ・鼻水症状に関与する主要細胞内シグナル(PKCδ シグナルと NFAT シグナル). B: IL-33 増加/好酸球増多に関する細胞内シグナル(PKCδ シグナル). PKCδ シグナル、及び、NFAT シグナルに対する抑制薬が、アユルベータ医薬に含有されることが予想される。

一方、ゲノムワイド関連解析に関する大規模国際共同研究により、IL-33 遺伝子の気管支喘息発症への関与が明らかにされ (Moffatt MF et al. New Eng J Med, 2010)、また、IL-33 の気管支喘息 (Oboki K et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2010)、アトピー性皮膚炎 (Yasuda K et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2012) への関与が明らかにされた。そこで、新規治療薬開発のために、IL-33 遺伝子発現機構解明は必須である。申請者は、アレルギー性鼻炎患者において、血中好酸球数と IL-33 が相関することを見いだした (図 3)。更に、繊維芽細胞において、PKC 活性化による IL-33 遺伝子発現亢進を見いだした (図 2)。

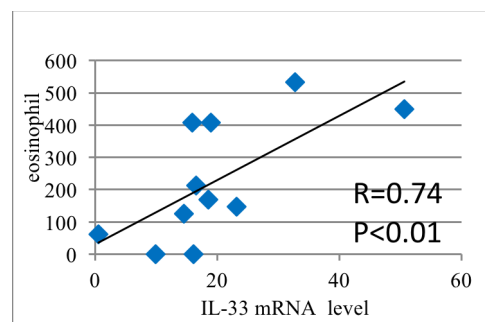


図3. 花粉症患者における好酸球数と IL-33 mRNA レベルの相関性

2. 研究の目的

本課題における研究項目は以下の通りである。

(1) 抗アレルギー作用の伝承を持つアユルベータダ医薬の収集、及び、聞き取り調査：インドにおいて、各地域固有の抗アレルギー性アユルベータダ医薬の収集と聞き取り調査を行う。収集した抗アレルギー性アユルベータダ医薬の PKC δ 抑制活性、及び、NFAT 抑制活性を測定し、アユルベータダ医薬の機能的分類表を完成させる。

(2) PKC δ 抑制作用、及び、NFAT 抑制作用で区分した抗アレルギー性アユルベータダ医薬の機能的分類表作成：PKC δ 抑制性アユルベータダ医薬と NFAT 抑制性アユルベータダ医薬の併用投与により、アレルギー性鼻炎モデルラットの高度症状改善を明らかにする。また、PKC δ 抑制性アユルベータダ医薬を気管支喘息モデルマウスに投与し、IL-33 遺伝子発現亢進、及び、好酸球増多に対する抑制作用を明らかにする。

(3) 気管支喘息モデルマウスの IL-33 遺伝子発現亢進、好酸球増多、及び、気道リモデリングに対する、PKC δ 抑制性アユルベータダ医薬投与による抑制作用：新規アレルギー疾患治療薬開発のために、アユルベータダ医薬由来 PKC δ 抑制薬、及び、NFAT 抑制薬の精製・単離、及び、化学構造決定を行い、更に、抑制薬の標的分子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗アレルギー作用の伝承を持つアユルベータダ医薬の収集、及び、聞き取り調査：インド各地には、地域固有の抗アレルギー性アユルベータダ医薬が多く存在すると言われている。そこで、インド各地において、抗アレルギー性アユルベータダ医薬の収集旅行を行う。新規の抗アレルギー性アユルベータダ医薬発掘のために、その地域で実際に治療に使われている伝承医薬の聞き取り調査を行う。異なるアユルベータダ医薬の併用が、強力な治療効果を生じる治療例に留意する。調査結果の解析に、薬効の程度を数値化可能な VAS (visual analogue scale) を用いる。天然物の薬効は、季節性があるので、雨季と乾季に収集旅行を行う。インド国内旅行、及び、アユルベータダ医薬の情報収集ために、ムケルジ博士の協力を得る。

(2) アユルベータダ医薬含有 PKC δ 抑制薬、NFAT 抑制薬の同定、標的分子の同定、及び、薬理機構の解明：HeLa 細胞の H1R 刺激により誘発される H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用を指標に、PKC δ 抑制性アユルベータダ医薬から、PKC δ 抑制薬を、有機溶媒抽出、オープンカラム、及び、高速カラムによるクロマトグラフィーを駆使して、精製・単離を行う。そして、単離に成功した

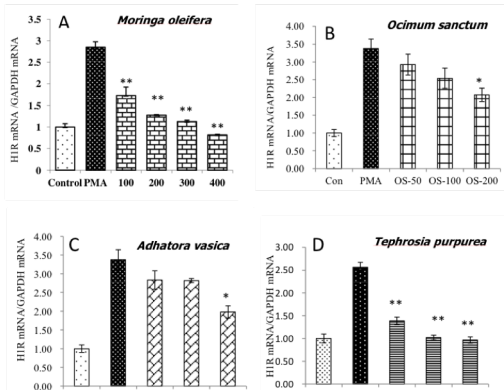
PKC δ 抑制薬の化学構造決定を行う。更に、単離した PKC δ 抑制薬を、Swiss3T3 細胞に投与し、PKC 活性化による IL-33 mRNA レベルの上昇に対する抑制作用を明らかにする。PKC δ 抑制薬の場合と同様に、RBL-2H3 細胞のイオノマイシン刺激により誘発される IL-9 mRNA レベル上昇に対する抑制作用を指標に、NFAT 抑制性アユルベータダ医薬から、NFAT 抑制薬の精製・単離、化学構造決定を行う。同定に成功した PKC δ 抑制薬、及び、NFAT 抑制薬を利用して、新規アレルギー疾患治療薬を開発し、アレルギー性鼻炎のくしゃみ・鼻水症状、及び、好酸球性炎症を改善させることが可能である。一般に、天然物由来薬物は、標的分子に対する特異性が低いことから、副作用のリスクが高いと考えられる。そこで、PKC δ 抑制薬、及び、NFAT 抑制薬の標的分子の同定を行う。方法として、PKC δ 抑制薬、及び、NFAT 抑制薬をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー、PKC δ ・GFP 複合体、及び、NFAT・GFP 複合体を細胞ライセートと混合し、標的分子を結合させ、抗 GFP 抗体を用いて複合体と結合する標的分子を回収する方法、ペプチドマスフィンガープリンティング法などの方法を駆使して、標的蛋白の同定を行う。そして、詳細な分子薬理機構解明を行う。

(3) PKC δ 抑制作用、及び、NFAT 抑制作用で区分した抗アレルギー性アユルベータダ医薬の機能的分類表作成：これまでの研究により、アレルギー疾患モデル動物における疾患感受性遺伝子の発現亢進は、上に述べた培養細胞における遺伝子発現亢進と同じ機構を介することを明らかにしている。即ち、培養細胞 (HeLa 細胞、及び、Swiss3T3 細胞) を、それぞれヒスタミン、及び、PKC 活性化ホルボールエステル (PMA) で刺激することにより、PKC δ 活性化による H1R 遺伝子、及び、IL-33 遺伝子発現亢進が引き起こされた (図 2、図 3)。また、培養細胞 (RBL-2H3 細胞) をカルシウムイオノフォアで刺激することにより、NFAT シグナルを介した IL-9 遺伝子発現亢進が引き起こされた。そこで、収集した抗アレルギー性アユルベータダ医薬抽出液投与による H1R 遺伝子、及び、IL-33 遺伝子発現亢進に対する抑制度を測定することにより、PKC δ 抑制作用を明らかにする。また、アユルベータダ医薬抽出液投与による IL-9 遺伝子発現亢進に対する抑制度の測定により、NFAT シグナル抑制作用を明らかにする。以上の結果をまとめて、PKC δ 抑制性、及び、NFAT 抑制性に区分した抗アレルギー性アユルベータダ医薬の機能的分類表を作成する。

4. 研究成果

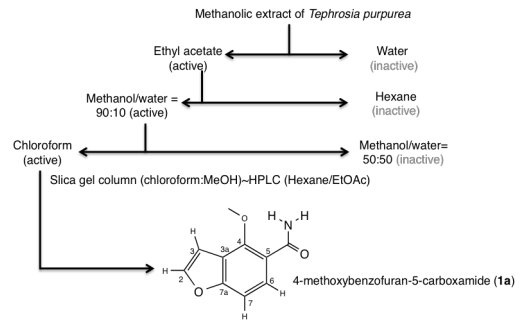
(1) 抗アレルギー作用の伝承を持つアユル

ベータ医薬の収集、及び、聞き取り調査: アユルベータ医薬には、抗アレルギー作用を期待して用いられるものが多数存在するが、どのような薬理作用により抗アレルギー作用を発揮するかについては明確ではない。一方、我々は、アレルギー性鼻炎の症状発現に、3つの細胞内シグナルとその下流の疾患感受性遺伝子(ヒスタミンH₁受容体(H1R)遺伝子、IL-9遺伝子、及びIL-33遺伝子)の発現亢進が関与することを明らかにした。そこで、インドジャダプール大学ムケルジー博士及びバングラデシュクルナ大学ダス博士の協力のもとどのようなアユルベータ医薬がアレルギー疾患に対して用いられているかを調査した。調査結果をもとに *Coccinia cordifolia*, *Moringa oleifera*, *Ocimum sanctum*, *Adhatora vasica*, *Tephrosia purpurea*, *Cinnamomum tamala* の6種類のアユルベータ医薬をピックアップし、そのH1R遺伝子発現抑制効果を検討した。その結果、*Moringa oleifera*, *Ocimum sanctum*, *Adhatora vasica*, *Tephrosia purpurea* のメタノール抽出液にH1R遺伝子発現抑制活性が認められた。*Coccinia cordifolia* 及び *Cinnamomum tamala* には遺伝子発現抑制活性は認められなかった。

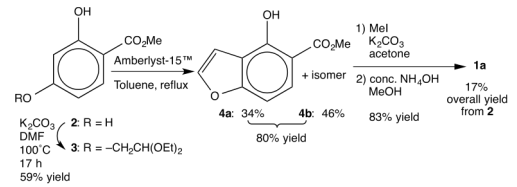


(2) アユルベータ医薬含有 PKCδ 抑制薬、NFAT 抑制薬の同定、標的分子の同定、及び、薬理機構の解明: H1R 遺伝子発現抑制活性が認められた4つのアユルベータ医薬のう

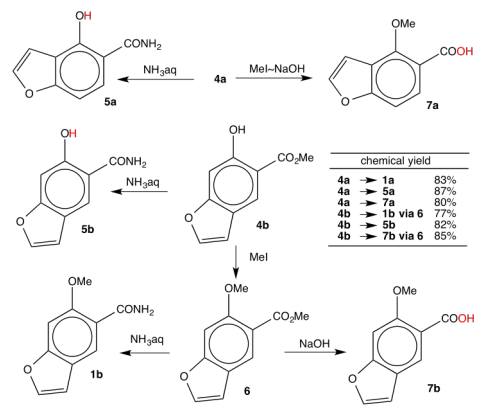
ち、最も強い活性を示した *Tephrosia purpurea* から有効成分の単離を試みた。HeLa 細胞におけるPMA刺激に伴うH1R遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標に、図xに示すスキームによりH1R遺伝子厚原抑制化合物を単離した。単離した化合物のH1R遺伝子発現抑制に対するIC₅₀値は75.3μMであった。



単離した化合物の構造決定を行なったところ、有効成分は4-methoxybenzofuran-5-carboxamide (HMBC, 1a)であることが明らかとなった。次にHMBCを合成した。合成HMBCのH1R遺伝子発現抑制に対するIC₅₀値は83.7μMと*T. purpurea*から単離したHMBCと同程度であることが明らかとなった。

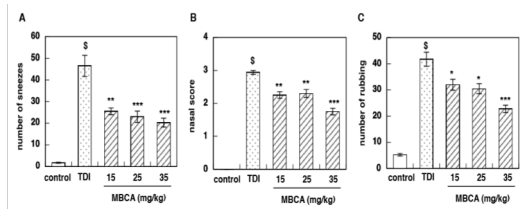


さらに、HMBCの異性体(1b)を合成し、そのH1R遺伝子発現抑制活性を検討したところそのIC₅₀値は49.1μMとなりHMBCより抑制活性が強いことが明らかとなった。

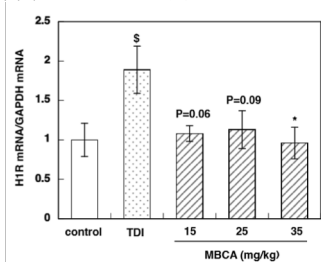


[HMBC の鼻症状改善効果]

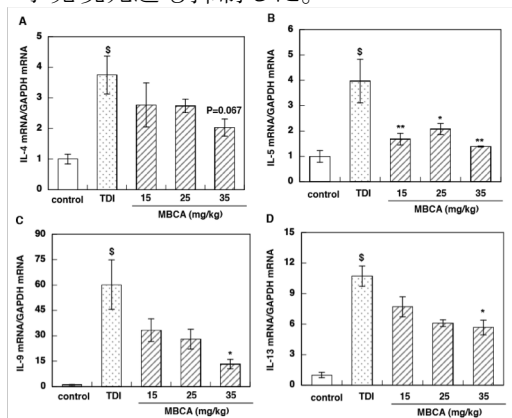
鼻過敏症モデルラットを用いた HMBC の鼻症状改善効果を検討した。その結果、HMBC は TDI 刺激により惹起される鼻症状を有意に改善することが明らかとなった。



また、TDI 刺激に伴う鼻粘膜 H1R 遺伝子発現も抑制することが明らかとなった。



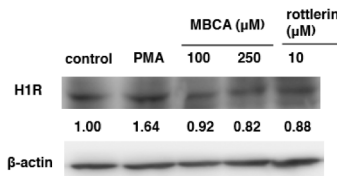
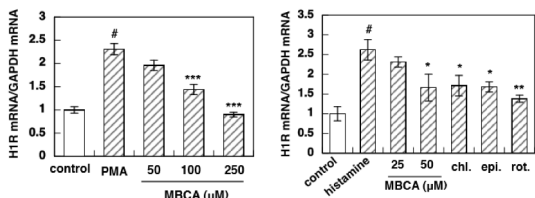
さらに、IL-4、IL-5、IL-9、及び IL-13 遺伝子発現亢進も抑制した。



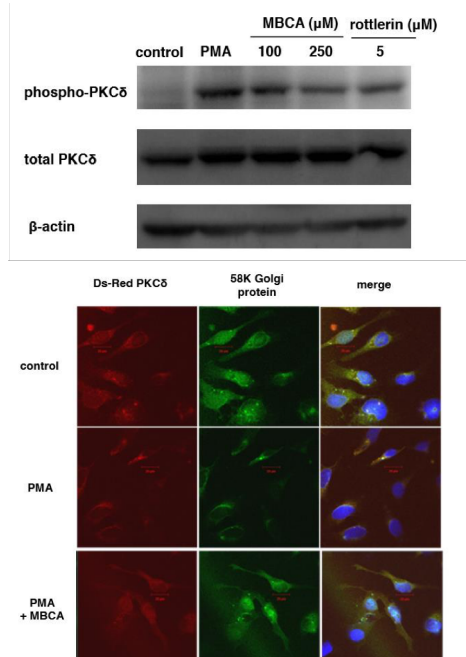
以上の結果から、HMBC は TDI 刺激により発現亢進した H1R 遺伝子や Th2 サイトカイン遺伝子の発現を抑制することで鼻症状を改善したと考えられた。

[H1R 遺伝子発現抑制の分子機構]

MBCA は HeLa 細胞における PMA またはヒスタミン刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を濃度依存的に抑制した。また、これに伴い H1R タンパク発現量も減少した。



これまでに、HeLa 細胞における PMA またはヒスタミン刺激に伴う H1R 遺伝子発現に PKCδシグナルが関与することを証明してきたが、MBCA は、PMA 刺激に伴う PKCδの活性化の指標である Tyr³¹³ のリン酸化を抑制し、PKCδのゴルジ体への移行を抑制することが明らかとなった。



(3) PKCδ 抑制作用、及び、NFAT 抑制作用で区分した抗アレルギー性アユルベーダ医薬の機能的分類表作成：T.purpurea から単離・同定したヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制化合物 MBCA 及びその異性体についてその抗アレルギー活性について検討した。その結果、これらの化合物が H1R 遺伝子や IL-4、IL-5、IL-9 遺伝子発現だけでなく、IL-33 遺伝子発現亢進も抑制することが明らかとなった。また、さらなるアユルベーダ医薬のスクリーニングにより、強い IL-9 遺伝子発現亢進抑制活性を有する幾つかのアユルベーダ医薬を見出した。

Plants	IC ₅₀ for H1R	IC ₅₀ for IL-9
Pterocarpus marsupium	61.7	7.74
Swertia chirata	131	5.18
Artocarpus heterophyllus	NI*	53.15
Agele marmelos	13.5	NI
Murraya koenjei	NI	0.24
Kalanchoe blossfeldiana	19.4	NI

[まとめ]

本研究結果から、抗アレルギー性アユルベータ医薬 T. purpurea から新機構アレルギー化合物 MBCA を単離同定できた。またその異性体にも強い抗アレルギー活性があることが明らかとなった。さらに、IL-33 遺伝子発現抑制抑制効果も見られたことから MBCA が花粉症の急性症状だけでなく慢性症状改善にも効果があることや、これまでになかった好酸球性炎症に対する治療薬としても効果があることが予想された。アユルベータ代役には、H1R 遺伝子だけでなく、IL-9 遺伝子や IL-33 遺伝子発現を抑制するものも多く、非常に有用な資源となることが示唆された。

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 3 件)

1. Shill MC, Das AK, Itou T, Karmakar S, Mukherjee PK, Mizuguchi H, Kashiwada Y, Fukui H, Nemoto H. The isolation and synthesis of a novel benzofuran compound from Tephrosia purpurea, and synthesis of several related derivatives, which suppress histamine H1 receptor gene expression. *Bioorg Med Chem.* 2015;23:6869-6874. 査読あり
2. Shill MC, Mizuguchi H, Karmakar S, Kadota T, Mukherjee PK, Kitamura Y, Kashiwada Y, Nemoto H, Takeda N, Fukui H. A novel benzofuran, 4-methoxybenzofuran-5-carboxamide, from Tephrosia purpurea suppressed histamine H1 receptor gene expression through a protein kinase C- δ -dependent signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2015; 30:18-26. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. Fukui H Histamine H1 receptor gene as a sensitive gene of nasal hypersensitivity and clinical significance of antihistamines. (招待講演) 45th Annual Meeting of the European Histamine Research Society 2016.5.11~5.16 Florence, Italy
2. 福井裕行、水口博之、柏田良樹、根本尚夫、武田憲昭 抗アレルギー性天然物医薬有効成分の分子薬理機構 (招待講演) 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18~3.20 名古屋国際会議場 名古屋市 愛知県
3. Fukui H. Improvement of symptoms by anti-allergic natural medicines through suppression of histamine H1 receptor gene expression. 2nd International Congress of Society for Ethnopharmacology (招待講演) 2015. 2.20~2.22 Nagpur India
4. Shill MC, Mizuguchi H, Fukui H. Isolation

of novel anti-allergic compound from Tephrosia purpurea and Chemical synthesis of the compound and its relevant structural compounds. 第 18 回日本ヒスタミン学会 2014.10.10~10.11 都ホテルニューアルカイック 尼崎市 兵庫県

5. 福井裕行 抗ヒスタミン薬の抗アレルギー作用発現機構 第 21 回四国四大学皮膚科研究会 (招待講演) 2014. 6.28 ホテルグランドパレス徳島 徳島市 徳島県
6. Fukui H, Mizuguchi H, Kitamura Y, Takeda N. Important of symptoms with correlative suppression of allergic disease sensitive gene expression. The 43rd European Histamine Research Society Annual Meeting 2014. 5.6~5.9, Lyon, France.

[図書] (計 2 件)

1. Fukui H, Mizuguchi H, Nemoto H, Kitamura Y, Kashiwada Y, Takeda N. Histamine H₁ receptor gene expression and drug action of antihistamines. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Histamine Receptors, ed. Martin Michel, pp161-169, 2016 (Springer Science, NewYork).
2. Fukui H, Mizuguchi H, Kitamura Y, Takeda N. Clinical significance of histamine H₁ receptor gene expression and drug action of antihistamines. In: Receptor series, "The Receptors", Histamine Receptors, ed. Giuseppe Di Giovanni. pp157-172, 2016 (Springer Science, NewYork).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井裕行 (FUKUI Hiroyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・

特任教授

研究者番号：90112052