

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461495

研究課題名(和文)ケモカイン受容体阻害活性を有する漢方薬のアレルギー治療への応用と有効成分の同定

研究課題名(英文) Screening of natural medicines with chemokine receptor antagonists for allergy therapy

研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：60319663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに研究代表者は和漢薬ライブラリーを用いて細胞遊走阻害活性を指標としたケモカインアンタゴニストの探索を行ってきた。本研究において、麻黄エキスがケモカイン受容体CCR3、CCR4、およびCCR8特異的なアンタゴニスト活性を示し、そのアンタゴニスト活性が麻黄エキスの酢酸エチル非可溶性分画に存在することを明らかとした。また、このアンタゴニスト成分による阻害活性にリガンド特異性はなく、受容体を直接阻害することが示唆された。CCR3、CCR4、およびCCR8は、いずれもTh2細胞あるいは好酸球や好塩基球に選択的に発現することから、アレルギー性疾患において重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemokine receptors CCR3 and CCR4 have been paid attention as potent therapeutic targets for allergic diseases. First, we screened 80 crude drugs/herbs to identify candidate substances using chemotaxis assay. Ephedra Herb inhibited the chemotaxis mediated by both CCR3 and CCR4. Thus, we examined inhibitory effects of ephedrine, a major component of Ephedra Herb. However, ephedrine exhibited little effects on the chemotaxis mediated by CCR3, CCR4, and CCR8. Therefore, we fractionated Ephedra Herb into four subfractions and examined the inhibitory effects of each subfraction. Ethyl acetate-insoluble fraction exhibited the inhibitory effects on chemotaxis and calcium mobilization mediated by CCR3 and CCR4 most significantly. Taken together, our data suggest that these crude drugs/herbs might be useful sources to develop new drugs targeting Th2-mediated allergic diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：ケモカイン ケモカイン受容体 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

ケモカインは白血球やリンパ球等の免疫担当細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり、その受容体は創薬の代表的な標的分子である7回膜貫通Gタンパク共役型受容体(GPCR)であり、19種類が確認されている。これらケモカインおよびその受容体はアレルギー疾患等に重要な役割を担っている。種々疾患のキーファクターとなるケモカインならびにその受容体が解明され、それら分子の相互作用を阻害することにより、アレルギー疾患を初めとした異常免疫応答に有効な治療効果を発揮できることから、現在、ケモカイン受容体のアンタゴニスト探索が精力的に展開されている。これまでに我々の研究グループは世界に先駆けて多くのケモカインならびにその受容体のクローニングに成功し、さらに生理的および病的な役割を詳細に明らかにすることで本研究領域を世界的にリードしてきた。さらに、19種類全てのケモカイン受容体に対して、各々受容体のみを遺伝子工学的に過剰発現させた免疫担当細胞株のラインナップ(細胞パネル)を作製し、これら細胞のケモカインへの遊走阻害を指標に、ケモカイン受容体のアンタゴニストの探索を網羅的に遂行できるシステムの構築してきた。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患はTh2細胞や肥満細胞、好酸球などが疾患部位に遊走することによって発症する。そのため、これらのエフェクター細胞の遊走を抑制することは、アレルギー性疾患の有効な治療戦略となると考えられる。この点、ケモカイン受容体 CCR3 は好酸球や一部の Th2 細胞に発現することが知られている、また、ケモカイン受容体 CCR4 は Th2 細胞に選択的に発現し、CCR4 のリガンドである TARC/CCL17 の血清値はアトピー性皮膚炎の重症度と強く相関することが知られている。これらのことから、CCR3 および CCR4 は様々なアレルギー疾患の重要な治療標的となると考えられる。これまでに合成化合物ライブラリーを用いた大規模探索によりいくつかの有用なリード化合物が同定されている。しかしながら、我々は天然物中にはユニークな構造を有する化合物が多く含まれるため、それらの中にはこれまでに同定されていない新規骨格を持つケモカインアンタゴニストが存在する可能性は極めて高いと推測した。本研究では、我々のケモカイン受容体発現細胞パネルシステムに標準和漢薬ライブラリーを供し、CCR3 および CCR4 に対するアンタゴニスト活性成分を同定し、アレルギー疾患治療への応用を試みた。

3. 研究の方法

標準和漢薬ライブラリーを用いたスクリ

ーニング

細胞遊走は CHEMOTX ケモタキシスチャンバー (Pore size 5 μ m) を用いて行った。L1.2 細胞の CCR3 および CCR4 安定発現細胞は細胞遊走バッファー (0.5% BSA, 20 mM HEPES pH7.4, RPMI-1640 without phenol red) で洗浄を 2 回行った後、 8×10^6 個/ml となるように懸濁した。ケモカインを細胞遊走バッファーで希釈して下部ウェルに 29 μ l 加え、 8×10^6 個/ml に調整した細胞を上部ウェルに 25 μ l (2×10^5 個) 加えた。チャンバーは 5% CO₂ インキュベーター中で 37 $^{\circ}$ C、2 時間放置した。下部ウェルに遊走した細胞を溶解溶液 (0.1% triton-X100, 10 mM Tris pH8.0) で溶解し、同時に PicoGreen 2 本鎖 DNA 定量試薬 (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いてラベルした。蛍光強度を励起光 485 nm/測定光 535 nm で測定し、細胞数を定量した。細胞遊走は上部ウェルにインプットした細胞の%として標記した。80 種類の標準和漢薬ライブラリーのケモカイン依存的な細胞遊走に与える影響を検討するために、これらを下部のケモカイン溶液に加えて細胞遊走解析を行い、阻害活性を測定した。

アンタゴニスト活性成分体の同定

細胞遊走は CHEMOTX ケモタキシスチャンバー (Pore size 5 μ m) を用いて行った。L1.2 細胞の CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 および CCR8 安定発現細胞は細胞遊走バッファー (0.5% BSA, 20 mM HEPES pH7.4, RPMI-1640 without phenol red) で洗浄を 2 回行った後、 8×10^6 個/ml となるように懸濁した。ケモカインを細胞遊走バッファーで希釈して下部ウェルに 29 μ l 加え、 8×10^6 個/ml に調整した細胞を上部ウェルに 25 μ l (2×10^5 個) 加えた。チャンバーは 5% CO₂ インキュベーター中で 37 $^{\circ}$ C、2 時間放置した。下部ウェルに遊走した細胞を溶解溶液 (0.1% triton-X100, 10 mM Tris pH8.0) で溶解し、同時に PicoGreen 2 本鎖 DNA 定量試薬 (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いてラベルした。蛍光強度を励起光 485 nm/測定光 535 nm で測定し、細胞数を定量した。細胞遊走は上部ウェルにインプットした細胞の%として標記した。麻黄湯、エフェドリン、麻黄エキス、麻黄分画のケモカイン依存的な細胞遊走に与える影響を検討するために、これらを下部のケモカイン溶液に加えて細胞遊走解析を行い、阻害活性を測定した。細胞はカルシウム濃度上昇反応解析バッファー (1% BSA, 10 mM HEPES pH7.4, HBSS) で洗浄を 2 回行った後、 1×10^6 個/ml となるように懸濁した。細胞懸濁液 1ml あたり fura2-AM (1 mM DMSO 溶液) (Molecular Probes) を 3 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間、暗所に放置した。洗浄を 2 回行った後、細胞を 5×10^6 個/ml となるように懸濁した。100 μ l の細胞懸濁液を石英セルに入れて、蛍光分光光度計 Fluorescence Spectrophotometer F-2500 (Hitachi, Tokyo, Japan) に配置し

た。ケモカイン刺激による蛍光強度の増強は励起光 485 nm/測定光 535 nm で測定した。麻黄由来の酢酸エチル非可溶性分画のケモカイン依存的な細胞内カルシウム濃度上昇反応に与える影響を検討するために、酢酸エチル非可溶性分画をケモカイン刺激の 30 秒前に前投与して解析を行った。

4. 研究成果

標準和漢薬ライブラリーを用いたスクリーニング

80 種類の標準和漢薬ライブラリーを用いてケモカイン受容体 CCR3 ならびに CCR4 を介した細胞遊走を阻害する和漢薬の同定を試みた。その結果、マオウは CCR3 および CCR4 を介した細胞遊走を阻害することを見出した (図 1)。また、マオウは CCR3、CCR4 のみならず CCR8 に対しても遊走阻害活性を示すことを明らかとした。

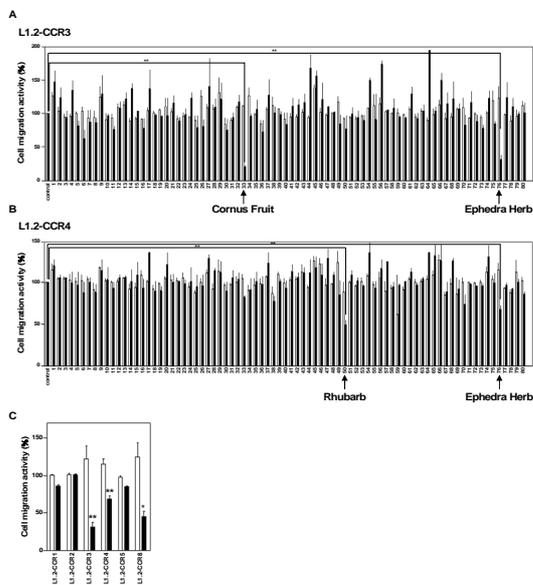


図 1. 標準和漢薬ライブラリーを用いたスクリーニング

- A. CCR3 を介した細胞遊走阻害活性
- B. CCR4 を介した細胞遊走阻害活性
- C. マオウの CCR1~5,8 に対する細胞遊走阻害活性

アンタゴニスト活性成分の同定
初めに麻黄湯に関して、ケモカイン CCR3、CCR4 と CCR8 受容体に関するアンタゴニスト活性を評価した。その結果、麻黄エキスと比べて麻黄湯の CCR3 と CCR4 に対するアンタゴニスト活性が弱いこと、および CCR8 に対してはその活性は有しないことが確認された (図 2)。

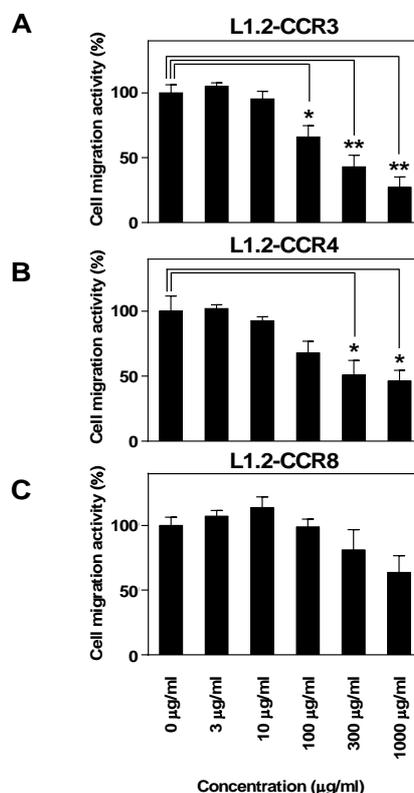


図 2. 麻黄エキスの CCR3, CCR4, CCR8 に対する細胞遊走阻害活性

- A. CCR3 に対する細胞遊走阻害活性
- B. CCR4 に対する細胞遊走阻害活性
- C. CCR8 に対する細胞遊走阻害活性

次に、マオウの主成分であり既に抗アレルギー作用が知られているエフェドリンについて、ケモカイン CCR3、CCR4 と CCR8 受容体に関して検討した結果、これら 3 種類の受容体に対して、優位なアンタゴニスト活性は確認できなかった (図 3)。

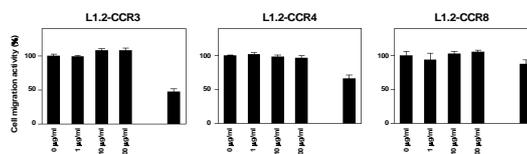


図 3. エフェドリンの CCR3, CCR4, CCR8 に対する細胞遊走阻害活性

そこでマオウエキスから、酢酸エチル可溶性分画、酢酸エチル非可溶性分画、クロロホルム可溶性分画、および水溶性分画の 4 つの分画を調整した結果、酢酸エチル非可溶性分画にもとのマオウエキスより強い CCR3 と CCR4 に対するアンタゴニスト活性が確認された (図 4)。

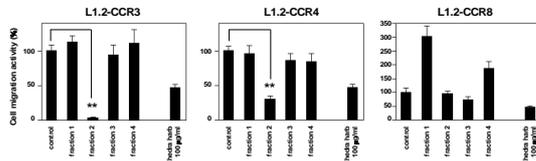


図4 . 麻黄エキスからの各抽出成分の CCR3, CCR4, CCR8 に対する細胞遊走阻害活性
 Fraction 1: 酢酸エチル可溶性分画
 Fraction 2: 酢酸エチル非可溶性分画
 Fraction 3: クロロホルム可溶性分画
 Fraction 4: 水溶性分画

次に、麻黄由来の酢酸エチル非可溶性分画による細胞遊走阻害活性のケモカイン受容体特異性を検討した。既知の全てのケモカイン受容体の系統樹解析を行った結果、CCR3 と CCR4 は CCR1, CCR2, CCR5 および CCR8 に対して構造的類似性が高いことが示された。さらに CCR1~5 および CCR8 の L1.2 安定発現細胞株を用いた細胞遊走解析により、酢酸エチル不溶性分画のアンタゴニスト活性を解析した。CCR1 の細胞遊走は CCL5/RANTES、CCR2 は CCL2/MCP-1、CCR3 は CCL11/eotaxin、CCR4 は CCL22/TARC、CCR5 は CCL5/RANTES そして CCR8 は CCL1/I-309 を用いた結果、酢酸エチル非可溶性分画は、CCR1 に対しても弱いアンタゴニスト活性を示し、比較的 CCR3 と CCR4 に特異的なアンタゴニスト活性を示すことが確認された (図5)。

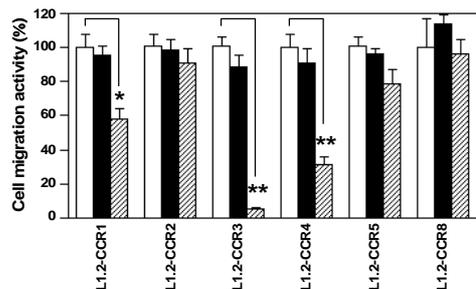


図5 . 麻黄エキスの酢酸非可溶性分画の CCR1~CCR5, CCR8 に対する細胞遊走阻害活性

一方、CCR3 と CCR4 にはそれぞれ複数のリガンドが存在しており、CCR3 のリガンドとしては、CCL11/eotaxin、CCL24/eotaxin-2、CCL26/eotaxin-3、CCL13/MCP-4、CCL5/RANTES、また、CCR4 のリガンドとしては CCL22/MDC と CCL17/TARC が知られている。そこで次にこれらのリガンドによる CCR3 と CCR4 を介した細胞遊走への酢酸エチル不溶性分画の影響を検討した。酢酸エチル非可溶性分画は、これら全てのリガンドによる CCR3 と CCR4 を介した細胞遊走が阻害した。これらのケモカインのアミノ酸レベルでの相同性は 30%程度で

あることから、酢酸エチル非可溶性分画によるアンタゴニスト活性は、リガンド側ではなく受容体側への直接作用によると考えられた (図6)。

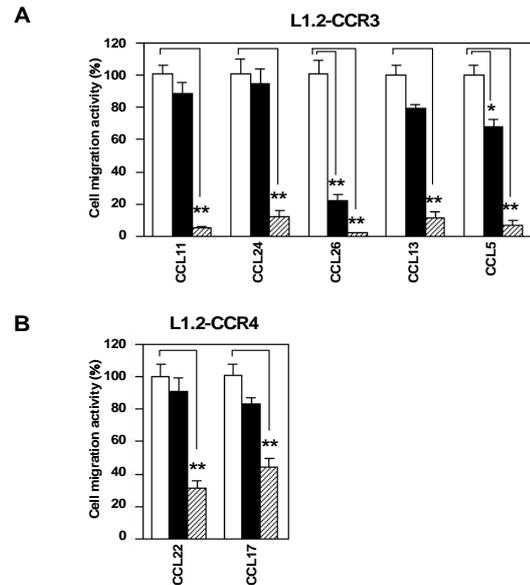


図6 . 麻黄エキスの酢酸非可溶性分画による CCR3 および CCR4 に対する細胞遊走阻害活性のリガンド特異性評価

- A. CCR3 に対する細胞遊走阻害活性
- B. CCR4 に対する細胞遊走阻害活性

また、ケモカイン受容体を介したシグナルは、三量体 G 蛋白質を介して伝達されるが、細胞遊走活性には G サブユニットが重要な役割を果たすことが知られている。一方で、サブユニットは、PLC の活性化を介して細胞内小胞体からのカルシウム放出を誘導し、この放出されたカルシウムは細胞遊走活性以外の、遺伝子発現誘導、細胞増殖活性、抗アポトーシス活性、血管新生作用などにおいて重要な役割を果たすと考えられている。そこで、次に酢酸エチル非可溶性分画のケモカイン刺激によって誘導される細胞内カルシウム濃度上昇反応における影響を検討した。CCL11/eotaxin と CCL22/MDC は、それぞれ CCR3 と CCR4 の L1.2 安定発現細胞株において、強い細胞内カルシウム濃度上昇反応を誘導した。これらの反応は、酢酸エチル非可溶性分画の前投与により、有意に抑制されることが確認された (図7)。この結果から、酢酸エチル非可溶性分画が細胞遊走活性以外のケモカイン機能も阻害する可能性が示唆された。

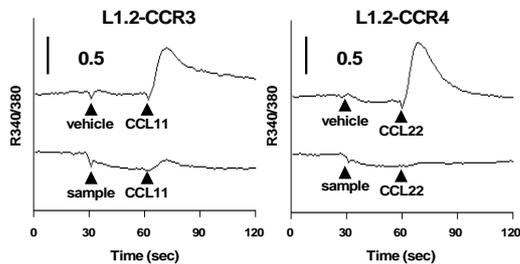


図7．麻黄エキス酢酸エチル非可溶性分画の細胞内カルシウム濃度上昇反応阻害活性

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)

Morikawa T, Hachiman I, Matsuo K, Nishida E, Ninomiya K, Hayakawa T, Yoshie O, Muraoka O, Nakayama T. Neolignanes from aril of *Myristica fragrans* as potent antagonists of CC chemokine receptor 3. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 2005-2013.

Matsuo K, Koizumi K, Fujita M, Morikawa T, Jo M, Shibahara N, Saiki I, Yoshie O, Nakayama T. Efficient use of a crude drug/herb library reveals *Ehedra Herb* as a specific antagonist for Th2-specific chemokine receptors CCR3, CCR4, and CCR8. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016, 4, 54.

Matsuo K, Itoh T, Koyama A, Imamura R, Kawai S, Nishiwaki K, Oiso N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T. CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma. *Cancer Lett.* 2016, 378, 16-22.

[学会発表](計 5 件)

東山慎太郎、松尾一彦、松永奈緒子、山田祐毅、西脇敬二、義江修、中山隆志 CCR4 阻害剤は Treg の筋肉組織への遊走を阻害することでワクチン効果を向上させる 日本薬学会第 137 年会(仙台国際センター、宮城) 2017 年 3 月 25 日～27 日

山田祐毅、松尾一彦、小山篤、義江修、中山隆志 CCR4 阻害剤による Treg 抑制は筋肉内投与ワクチンの効果を向上させる 第 66 回日本薬学会近畿支部大会(大阪薬科大学、大阪) 2016 年 10 月 15 日

小山篤、松尾一彦、西脇敬二、義江修、中山隆志 抗原特異的免疫応答の誘導におけるケモカイン受容体 CCR4 の役割ならびに CCR4 阻害剤のアジュバント活性評価 日本薬学会第 136 年会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016 年 3 月 27 日～29 日

小山篤、松尾一彦、西脇敬二、義江修、中山隆志 抗原特異的免疫応答におけるケモカイン受容体 CCR4 の役割 第 65 回日本薬学会近畿支部(大阪大谷大学、大阪) 2015 年 10 月 17 日

西馬伶、松尾一彦、小泉桂一、義江修、中山隆志 和漢薬ライブラリーを利用したケモカイン受容体 CCR3 及び CCR4 のあんだ後に巢 t 成分の探索 日本薬学会第 135 年会(デザイン・クリエイティブセンター、兵庫) 2015 年 3 月 26 日～28 日

6．研究組織

(1)研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号：60319663

(2)研究分担者

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)
近畿大学・薬学部・講師
研究者番号：70615921