

ニッポンハム食の未来財団 2020 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	制御性 T 細胞の分化制御に関わる核内受容体に作用する食品由来成分の探索と有効性解析
フリガナ	コタニ ヒトシ
代表者名	小谷 仁司
所属機関 (機関名) (役職名)	島根大学医学部医学科 免疫学講座 講師
本助成金による 発表論文, 学会発表	発表論文、学会発表ともになし

研究結果要約

本研究では、健康で幸せな食生活を営み、多くの人々が食を楽しむことを可能とすることを目的として、食物アレルギーの予防・治療に有効な食品成分の探索研究を行うこととした。腸管における免疫寛容を担う免疫細胞である制御性 T 細胞を分化制御する核内受容体 NR4A2/RXR をターゲットとして、これらに作用する食品由来成分の探索をおこなった。まず、奄美・沖縄由来の植物エキスを作成し、1200 種類ほどのエキスを作成した。これらと食品由来の素材を多く含む生薬エキスライブラリー150 種類について、作成した NR4A2/RXR の活性化評価系でスクリーニングした。その結果、いくつかのエキ스로 NR4A2/RXR の活性化を見出した。その中で、これまでの研究から RXR に作用する成分を見出しているハウノキの樹皮コウボクと、マメ科植物の根茎サンズコンに活性があることから、それらの成分に関して評価をおこない、ホーノキオールおよびプレニルフラボノイド 3 種類にアゴニスト活性が確認された。さらに、ナイーブ T 細胞を用いた制御性 T 細胞への分化促進を評価したところ、ホーノキオールおよびプレニルフラボノイド 2 種類に分化促進効果が見られたが、プレニルフラボノイドの 1 種類に関しては逆に抑制効果が確認された。今後、実験動物を用いた有効性の評価や、これら以外の食品由来素材の持つ詳細な有用性についても評価していきたい

と考えている。

## 研究目的

食は人々の生活で重要な部分を占めており、健康的な食生活や食を楽しむことで人々の生活における QOL は大幅に向上すると考えられている。一方、食物に対するアレルギーを有する人は、食べ物の種類の制限や、アレルギー物質が入っていないかなどを恐れながら食事を行うことになり、旅行や外食などを友人などと十分に楽しむことができない状況が多く存在する。集団生活を営む上で食物アレルギーが引き起こす問題は疾患というものの自体よりも、精神的な面での影響が大きく、特に集団行動を多くおこなう子供にとって重要な問題であり、不登校などにつながる原因ともなるような社会問題にもなっている。そこで本研究では、健康で幸せな食生活を営み、多くの人々が食を楽しむことを可能とすることを目的として、食物アレルギーの予防・治療に有効な食品成分の探索研究を行うことを考えた。ターゲットとしては、腸管における免疫寛容を担う免疫細胞の1つである制御性 T 細胞 (Treg) を分化制御するというメカニズムで、食品成分の探索をおこないたいと考えた。腸管免疫に関して、発展途上国における栄養不足による感染症や下痢症状による子供の死亡を、ビタミン A の摂取により大幅に防ぐことができるようになったということが知られている。<sup>1)</sup> このビタミン A の活性本体であるレチノイン酸が、腸管へのリンパ球のホーミング作用を促進していることや、免疫寛容に関わる制御性 T 細胞への分化を促進するなどの作用が報告<sup>1,2)</sup>されている。また、このレチノイン酸は核内受容体の retinoic acid receptor(RAR)や retinoid X receptor(RXR)に作用してその生理作用を示すことも報告<sup>3)</sup>されている。さらに、他の核内受容体である NR4A2 が制御性 T 細胞への分化誘導に重要であるという報告<sup>4)</sup>もあるが、この NR4A2 に関しては核内受容体のグループに属しているが、リガンドポケットがふさがっており、リガンドが存在しない核内受容体という特徴がある。そこで、様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し、その転写活性を補助する役割を持つ核内受容体 RXR とリガンドポケットのない NR4A2 とのヘテロダイマーをターゲットとすることにより、制御性 T 細胞への分化制御が可能な食品由来の成分を探索することとした。

## 研究計画及び研究手法

### ① 核内受容体 NR4A2/RXR のヘテロダイマー活性化評価系の作成およびスクリーニング

GAL4 融合タンパクとして核内受容体 NR4A2 をクローニングし、さらに RXR についてもクローニングを行い、GAL4 結合配列をプロモーターに持つレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ系を作成した。このアッセイ系は図 1 に示したように、ルシフェラーゼ活性を示す GAL4 結合配列に結合できるのは NR4A2 のみであり、RXR は GAL4 融合タンパクでないことから直接の結合はできない。したがって、このアッセイ系ではプロモーター配列に NR4A2 タンパクが結合し、ヘテロダイマーとして RXR が NR4A2 に結合したうえで、RXR に転写活性化を促すリガンドが結合しなければルシフェラーゼ活性の活性化は生じないという評価系となっている。この NR4A2/RXR ヘテロダイマーを活性化することができる化合物 XCT0135908 を評価系のポジティブコントロールとして使用するが、この化合物は市販されていない化合物であり、研

## ヘテロダイマー活性化検出実験

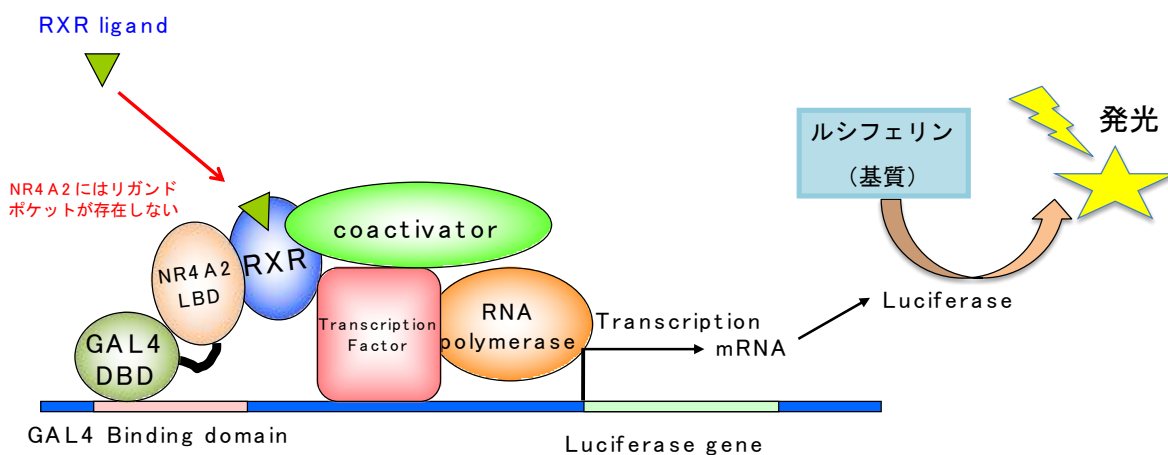


図 1 NR4A2/RXRヘテロダイマーの評価系

究協力者の湘南医療大学薬学部の片川准教授が有機合成したものを使用している。スクリーニングに使用したエキス濃度は 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である。

### ② 探索資源の準備

本研究では、食品由来の制御性 T 細胞分化制御物質の探索を目的としているが、その探索資源として1つはこれまでの研究で使用してきた生薬エキスイブラリー（メタノール抽出物）を利用することとした。生薬には生姜や山椒、シナモン、シソ、ハッカ、人参など食品として用いられる素材を多く含むことが知られており、さらに生薬として市販されているものに関しては、規程がありロット間での成分の違いが比較的少ないとされているため、研究としての再現性をとる必要があるという点で優れた探索資源である。さらに本研究では、沖縄産の植物エキスと奄美産の植物エキスを作成し探索資源として利用することとした。この計画は当初の計画から少し外れた内容となるが、幅広く食品として利用できる素材を増やすという意味では、本研究の研究内容に含まれる。この植物エキス（80%メタノール抽出物）は他大学の薬学部の研究者と協力して作成し、将来的に日本全国の特徴的な植物などの有効利用にも使用することを目的とし、採取した植物の標本や採取場所のGPSデータを保管することにより、研究の発展により再度植物が必要となった場合に入手することができるようにしたものである。既に採取は完了しており、抽出エキスの作成と保存を実施した。

### ③ ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化制御実験

制御性 T 細胞で特異的に蛍光タンパク EGFP を発現するトランスジェニックマウスを利用し、脾臓より採取したリンパ球を抗体の結合した磁気ビーズを用いて、ナイーブ T 細胞を分離精製し、*in vitro* での制御性 T 細胞への分化誘導条件（CD3 $\epsilon$  抗体、CD28 抗体、TGF $\beta$  刺激）に化合物などを添加し、3日後の制御性 T 細胞への分化誘導割合をフローサイトメーターで F $oxp3$ -EGFP 発現細胞（制御性 T 細胞細胞）の割合で評価した。

当初の研究計画では食物アレルギーモデルを用いて有効性の解析をおこなう計画にしていたが、新型コロナウイルス感染の全国的な流行などにより、研究活動の自粛や感染時の対応などのために、途中で実験を止めることができない動物モデルの実験に関しては保留とすることとした。探索研究や *in vitro* 解析を中心とする実験をすすめ、有用な食品素材などが見出されたものに関して、将来的に動物モデルでの有効性解析を実施していきたいと考えている。

## 結果と考察

奄美産および沖縄産植物エキス約 1200 種類を作成し、以前より所持している生薬エキス約 150 種類とともに探索資源とするエキ斯拉イブラリーとした。核内受容体 NR4A2 をクローニングし、GAL4 融合タンパクとして発現するように発現ベクターに導入した。また、NR4A2 とヘテロダイマーを形成する RXR についても RXR $\alpha$  および RXR $\gamma$  をクローニングし、発現ベクターに導入した。この GAL4-NR4A2、RXR の発現プラスミドと GAL4 結合配列をプロモーターに持つルシフェラーゼレポータープラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、そのアゴニスト活性を評価するアッセイ系とした。アッセイ系のポジティブコントロールとして、NR4A2/RXR ヘテロダイマー活性化の報告がある XCT0135908 を用いたところ、十分な活性化が評価できなかったため、XCT0135908 の論文報告を参考に、NR4A2 に関してリガンド結合ドメイン (LBD) だけをクローニングしたものを GAL4 融合タンパクとして発現ベクターに導入した。その結果、十分な濃度依存的な活性化が検出されたことから、このアッセイ系を用いてスクリーニングをおこなうこととした。このポジティブコントロールとして使用する XCT0135908 という化合物は、いくつか論文報告されているが市販されていない化合物であり、研究協力者である湘南医療大学薬学部の片川准教授が有機合成で作成したものであるが、本研究報告書においては詳細な合成スキームなどは省略することとする。次に、奄美・沖縄産植物エキスの作成に時間がかかるため、このアッセイ系を利用して既に所有している生薬エキ斯拉イブラリーを使用して、NR4A2LBD/RXR の活性化をスクリーニングした。その結果、活性を有する生薬エキスとしてコウボク (厚朴)、シュクシャ (縮砂) サンズコン (山豆根) の 3 つのエキスに活性を見出した。コウボクはモクレン科のホオノキの樹皮であり、ネオリグナンと呼ばれる特徴的な成分を含有する植物である。また、ホオノキの葉は岐阜県飛騨高山方面で朴葉 (ほおば) 味噌として郷土料理に使用されている。シュクシャはショウガ科の植物の種子であり、主に精油成分を含有する。サンズコンはマメ科サンズコンの根および根茎であり、ポリフェノールであるフラボノイドなどが含有されている。これらは、ショウガ科やマメ科などであり、食品としての利用がされているか厳密には分からないが、食品として摂取されているものと類縁の植

物由来のものである。この 3 つのうちコウボクとサンズコンに関しては、これまでに我々のグループで核内受容体 **RXR** に作用する成分が含有されていることを明らかにしている。しかし、これまでの研究で明らかにしてきた効果は、脂質代謝や糖代謝などを促進する異なる核内受容体とのヘテロダイマー活性化に関する内容であり、制御性 T 細胞の分化に関わる **NR4A2/RXR** ヘテロダイマーについての解析はおこなったことがなかった。そこで、コウボクとサンズコンに含有される **RXR** リガンドであるネオリグナン（ホーノキオール：HK）とプレニルフラボノイド（SPF1-3）について、ルシフェラーゼアッセイを用いて、**NR4A2/RXR** ヘテロダイマー活性化を評価した。まずは、**RXR $\alpha$**  とのヘテロダイマー活性化を評価したところ、濃度依存的な活性化が確認されたが、アッセイ系の感度があまり高くない結果となった。次に、**RXR $\gamma$**  とのヘテロダイマーを利用したアッセイ系で評価したところ、**RXR $\alpha$**  の時よりもより感度が高く濃度依存的な活性化が確認された。また、その活性を比較したところ、ネオリグナンよりプレニルフラボノイドのほうがより強い活性を示す結果が得られたが、この結果はこれまでに他の核内受容体とのヘテロダイマーで確認した結果と相関している結果となった。つぎに、これらの成分に関してナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化促進活性を評価することとした。ここでは、制御性 T 細胞だけで蛍光タンパク **EGFP** を発現するように遺伝子組換えされたトランスジェニックマウスを利用して、制御性 T 細胞への分化誘導割合をフローサイトメーターで解析することとした。マウスの脾臓を採取し、抗体と磁気ビーズを利用したマウスナイーブ **CD4<sup>+</sup>** T 細胞精製キットを利用し、ナイーブヘルパー T 細胞を単離精製し、制御性 T 細胞への分化誘導条件（**CD3 $\epsilon$**  抗体、**CD28** 抗体、**TGF $\beta$**  刺激）に前述の活性成分を添加し、3 日ほど *in vitro* で培養した後、フローサイトメーターで解析した。その結果、ホーノキオール(HK)およびプレニルフラボノイド 2 種類(SPF-1、SPF-2)で制御性 T 細胞への分化促進活性が見られた。しかし、プレニルフラボノイドのうちの 1 種類(SPF-3)に関しては、逆に抑制活性を示す結果が得られた。これらの結果より、核内受容体 **NR4A2/RXR** を用いたレポーターアッセイだけでは十分な解析ができないため、ある程度絞り込んだところで実際の制御性 T 細胞への分化促進活性を評価する必要があると考えられた。また、これらの解析を進めることと同時に、完成した奄美・沖縄産植物エキスの

NR4A2/RXR ヘテロダイマー活性化のスクリーニングを実施した。生薬エキス成分の解析の際に RXR $\gamma$  とのヘテロダイマーのほうがより感度が高い結果が得られていたことから、こちらのスクリーニング系では RXR $\gamma$  とのヘテロダイマーを用いて実施した。結果の図に示すようにポジティブコントロールである XCT0135908 と比較すると活性は低くなるが、いくつかの植物エキスにおいて活性を持つ植物エキスが存在することがあきらかとなった。今後、これらの植物に含有される活性成分を明らかにしていきたいと考えている。さらに、これらの植物エキスに関しては、RXR を介した他のヘテロダイマー活性化も考慮して活性成分を明らかにすることができるように、RXR リガンド結合ドメインを GAL4 融合タンパクとして導入したアッセイ系も作製し、そのスクリーニングも実施済みである。本研究において、多くの植物エキスを作成することができ、食物アレルギーへの改善・予防を目指した制御性 T 細胞誘導に利用できる成分の探索をおこなうことができた。しかし、今回おこなった実験内容はあくまで *in vitro* での核内受容体ヘテロダイマー活性化の評価と、一部の成分の制御性 T 細胞分化誘導の評価である。食品としてその有効性が発揮されるには、生体への吸収・代謝などの影響も含めた解析が必要であり、さらに腸管での制御性 T 細胞の抑制活性が発揮されることが重要である。今回の研究期間では、新型コロナウイルスの流行という社会情勢により実験時間の縮小などから実施することができなかったが、食物アレルギーモデルを使った動物実験での有効性をさらに評価する必要があると考えられる。また、NR4A2/RXR のヘテロダイマーをターゲットとした研究をおこなってきたが、他の核内受容体とのヘテロダイマー活性化による副作用などが存在しないかという解析も動物モデルでおこなう必要がある。特に、我々の過去の核内受容体研究では、LXR $\alpha$ /RXR のヘテロダイマーを活性化すると、肝臓における脂肪酸合成を活性化し、脂肪肝を発症するといった副作用が存在するため、そのような副作用についても確認が必要である。また、レチノイン酸受容体である RAR との RAR/RXR ヘテロダイマーを活性化することで、制御性 T 細胞への分化誘導を大きく促進するという報告もあるので、そちらを介した効果の併用も期待されるが、ビタミン A に関しては過剰摂取による催奇形性をはじめとした副作用が存在するので、副作用に関する注意も必要である。研究期間内での成果発表はできなかったが、今後これらの研究で

得られた研究成果に関して、学会における成果発表（日本生薬学会、日本薬学会、食品免疫学会など）をおこなうとともに、学術論文としても論文発表していきたいと考えている。



# GAL4-hNR4A2LBD/hRXR $\alpha$ Luciferase activity

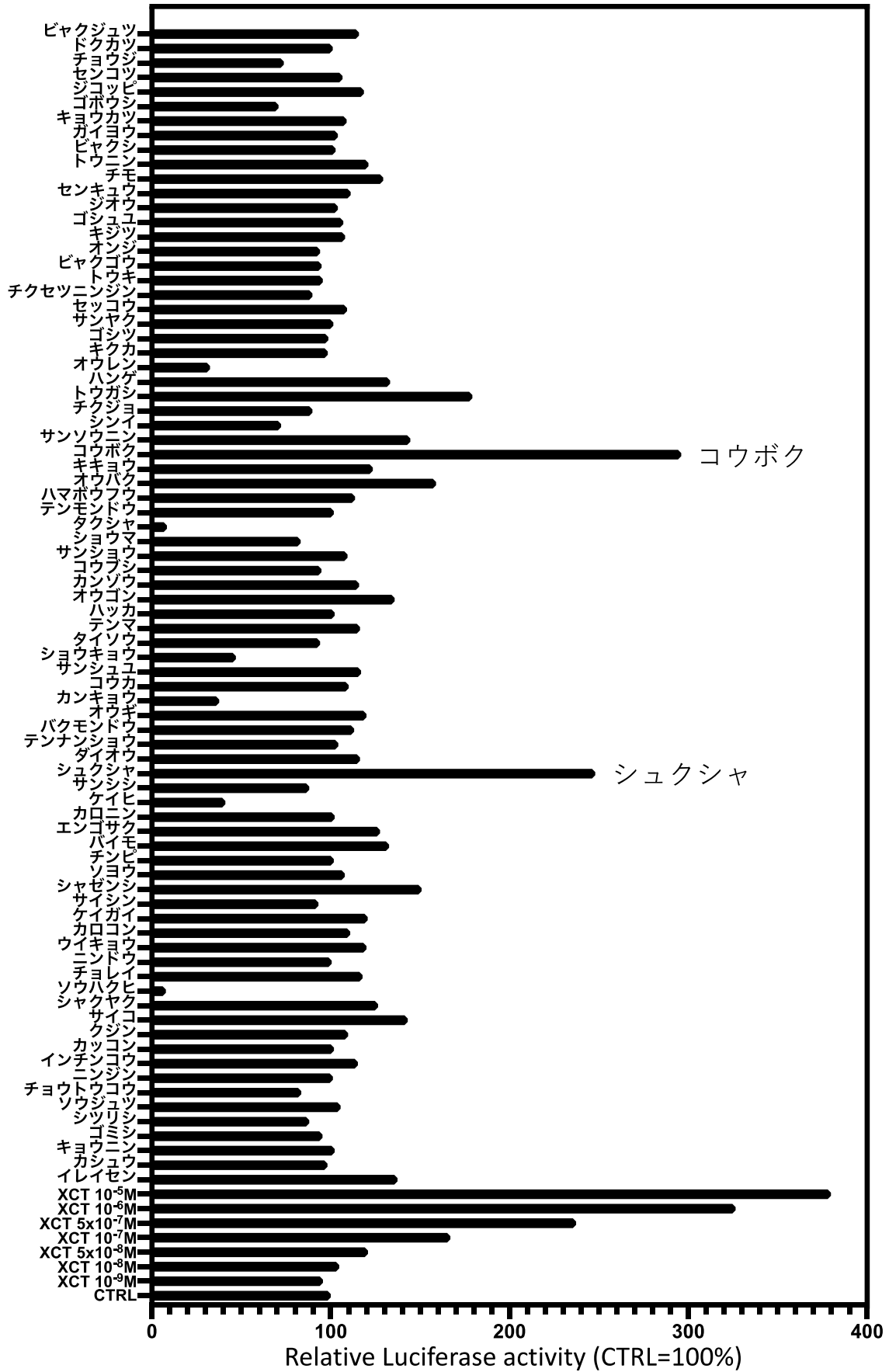


図2 生薬エキスのスクリーニング結果①

### GAL4-hNR4A2LBD/hRXR $\alpha$ Luciferase activity

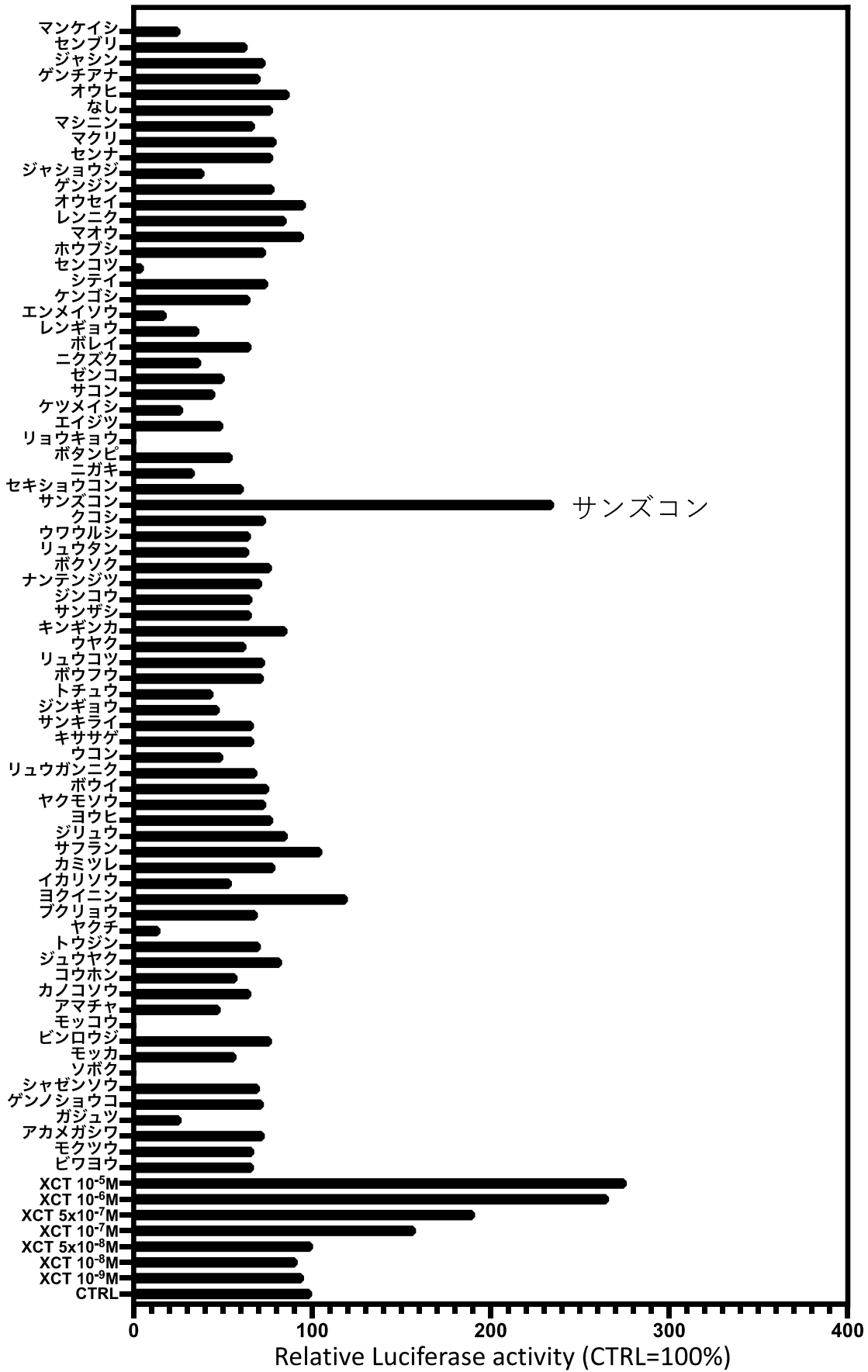


図3 生薬エキスのスクリーニング結果②

NR4A2LBD/RXR $\alpha$ とNR4A2LBD/RXR $\gamma$ の2つのレポーターアッセイにより、コウボク（HK）とサンズコン（SPF1-3）の含有成分のアゴニスト活性を評価した。

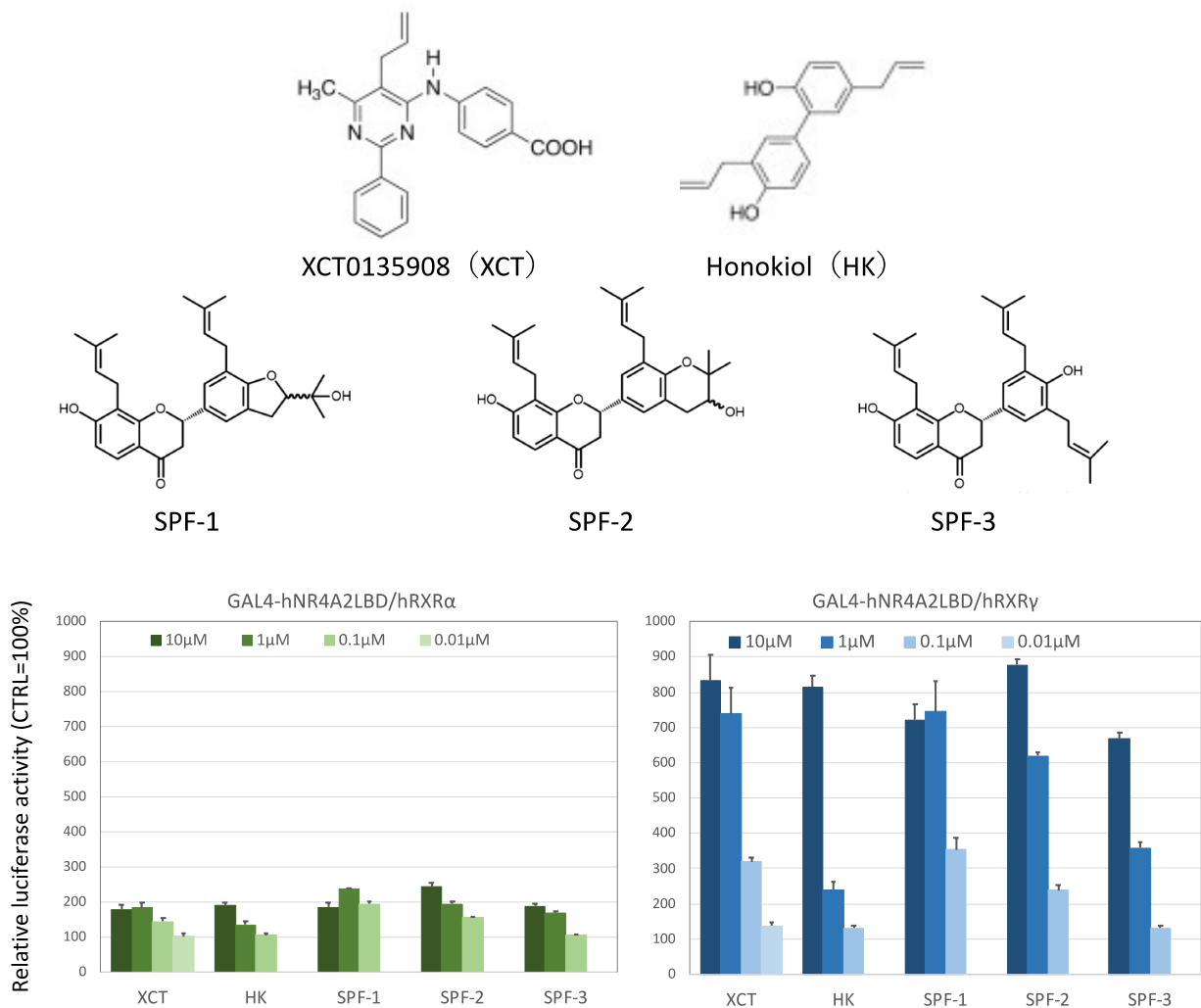


図4 コウボク、サンズコン含有成分の活性評価

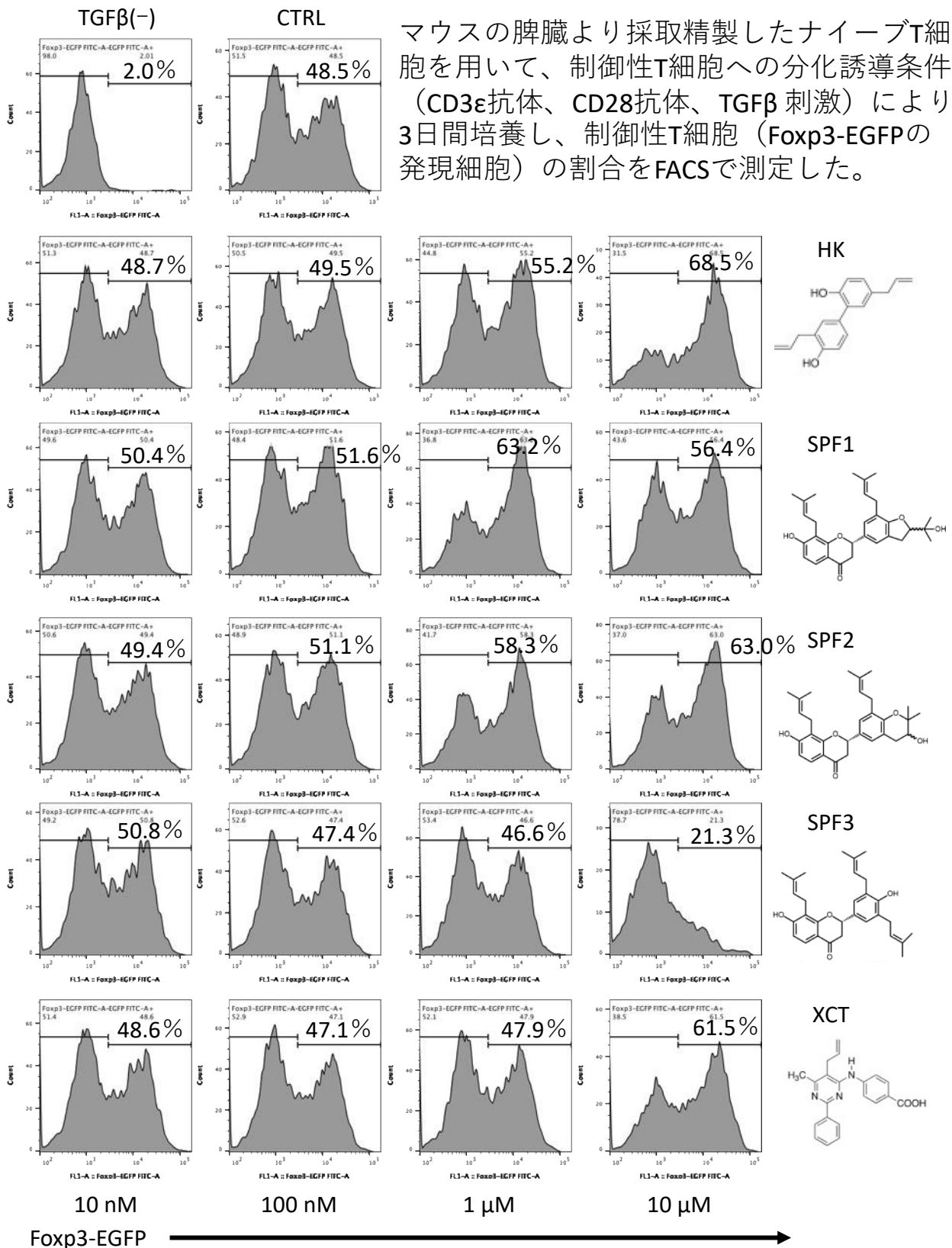


図5 コウボク、サンズコン含有成分の制御性T細胞分化促進活性評価

# GAL4-hNR4A2LBD/hRXR $\gamma$ Luciferase activity

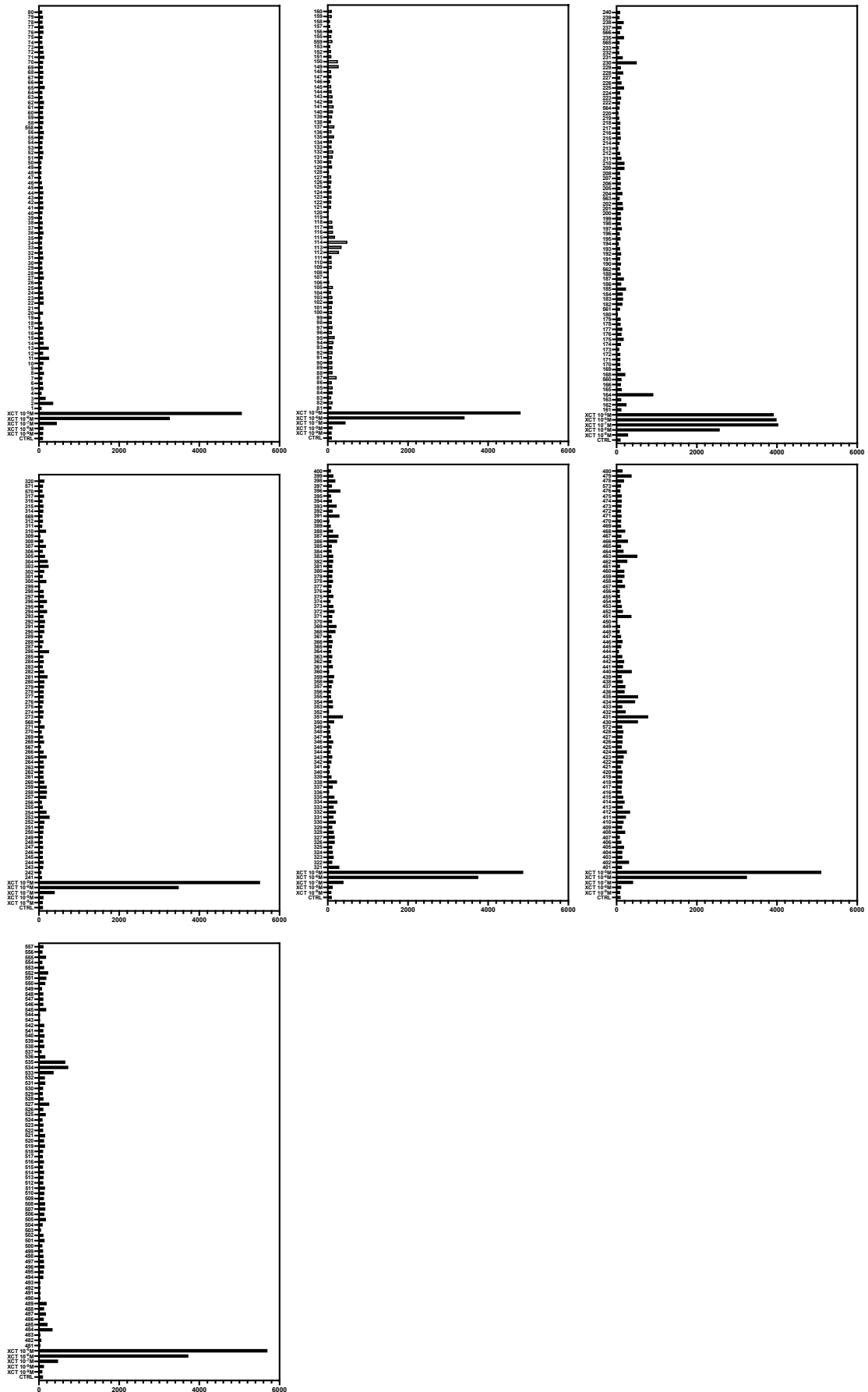


図6 奄美産植物エキスのスクリーニング結果

# GAL4-hNR4A2LBD/hRXR $\gamma$ Luciferase activity

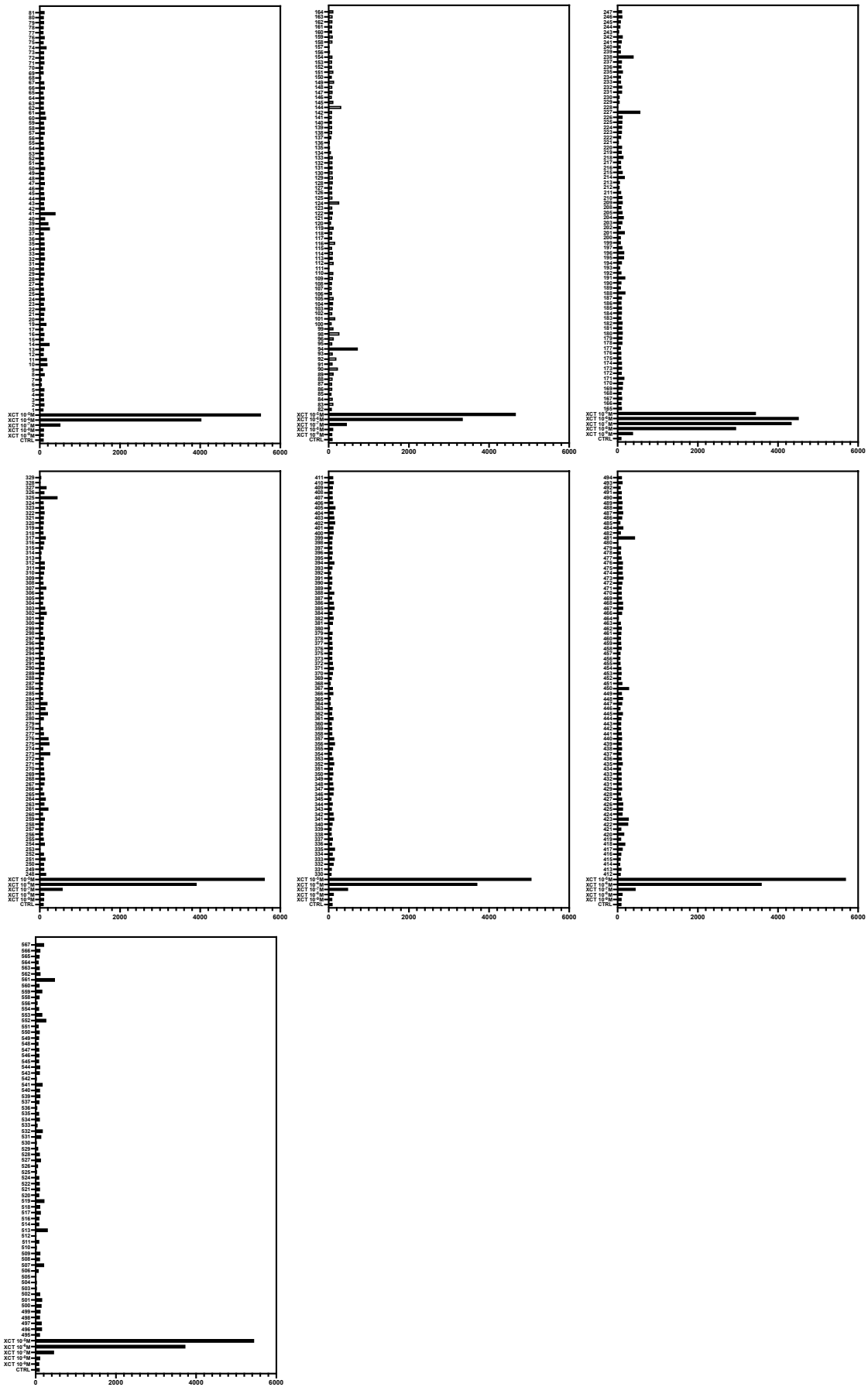


図7 沖縄産植物エキスのスクリーニング結果

## 今後の研究活動について

今回は、核内受容体 NR4A2 と RXR にターゲットを絞った研究を行ったが、RXR に関しては他の核内受容体とのヘテロダイマーを活性化することから、副作用として脂質代謝や糖代謝などへの影響などが無いかといったことも調べていく必要があると考えている。さらに、in vitro での解析と吸収や代謝などが影響する in vivo での有効性には大きな差が出てくると考えられる。この点に関しては食品として効果的なものをターゲットとしており、短期的な摂取ではなく、長期的に摂取することによって体質改善を含め、食物アレルギー改善・予防効果を期待するものであることから、餌に混ぜ込むなどの実験動物への長期的な投与での有効性を評価するような実験を今後おこなっていくべきであると考えている。また、本研究で行った制御性 T 細胞の分化制御に関わる核内受容体に作用する食品由来成分の探索に関しては、無数にある食品となりうる植物エキスのうちの一部であり、まだまだ多くの探索素材が存在する。しかし、多くの素材の活性評価だけでは不十分であり、その活性成分の単離精製、成分レベルでのアレルギー抑制効果の検討などが進める必要がある。しかし、このスクリーニングから単離精製・有効性解析までを単独の研究者によっておこなっていくには、実験量的に難しいため、今回の研究結果を1つの例として、単離精製を専門とする研究者や有効性解析を専門とする研究者と研究結果を共有し、共同研究として広く食物アレルギーの改善・予防につながる食品の開発に発展させていきたいと考えている。将来的には、医学部の臨床講座などとも連携し、ヒトなどを対象とした臨床研究に発展させ、研究成果を広く社会に還元していきたい。

## 参考文献

- 1) 岩田誠 腸管免疫におけるレチノイン酸の役割 化学と生物 vol.48 No 6. 2010
- 2) Makoto I, Asami H, Yuko E, Hiroyuki K, Chieko K, Si-Young S. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21(4):527-538 2004.
- 3) Hajime T, Aya N, Yoshiharu O, Hiroyuki K, Chieko K, Si-Young S, Makoto I. Retinoid X receptor agonists modulate Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell and Th17 cell differentiation with differential dependence on retinoic acid receptor activation. *J Immunol.* 191(7): 3725-3733 2013.

- 4) Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, Rudensky AY, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Commun.* 2:269 2011.
- 5) Athanasios D S, Xenophon A, Despina Z, Theodoros K, Stavros T, Zoe C, Xiaobing Q, Pavlos A, Liisa M S, Christina D, Hardy J R, Jens C S, Constantin T, Demosthenes F, Demetrios K V. Nurr1:RXR  $\alpha$  heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(15): 3999-4004 2017.

以上