

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	食物アレルギー予防・治療を目指した核内受容体リガンドによる制御性 T 細胞分化制御解析
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	日本薬学会 第 143 年会(札幌)でのポスター発表 28P1-am1-065 「T 細胞分化制御活性を有する天然化合物の解析」

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・治療に有用な新たな機序の医薬品開発に繋がる研究を行うこととした。制御性 T 細胞の分化制御をする核内受容体 NR4A2/RXR ヘテロダイマーをターゲットとして、制御性 T 細胞の分化促進する化合物を探索してきた。特に、核内受容体 NR4A2 はリガンドポケットを持たず、リガンド開発が難しいため、RXR とのヘテロダイマーとして間接的に活性化するリガンドとして、honokiol とプレニルフラボノイドに関して、ヘテロダイマーの選択性の検討および、他のヘテロダイマーを介した副作用の有無などを調べるとともに、食物アレルギーモデルによる有用性の検討を評価した。その結果、これらの化合物は NR4A2 に対して RXR を介して転写活性化を示すことを明らかにした。また、他の核内受容体を介した副作用の有無などをマウスに honokiol を投与した結果、LXR/RXR を介した脂肪肝は起きないことが確認された。さらに、通常時の honokiol の経口投与では、脾臓における制御性 T 細胞の割合が増加することはなく、予想に反し若干であるが減少傾向が確認された。また、食物アレルギーモデルを利用した honokiol による予防・治療効果に関しては、残念ながらモデル動物の症状も弱く、honokiol の効果が確認できなかった。

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充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・治療に有用な新たな機序の医薬品開発に繋がる研究を行うこととした。具体的には 2020 年度に研究助成を受けた「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と有効性解析」の研究成果で得られた NR4A2/RXR リガンドの研究を発展させ、より詳細なリガンドの機能解析と食物アレルギーに関する有効性解析を行い、食物アレルギーに有用な予防・治療薬の開発に繋げることを目指した。

核内受容体は脂溶性低分子化合物をリガンドとし、様々な遺伝子発現を制御することが知られている転写因子である。ヒトには 48 種類の核内受容体が存在し、脂質代謝・糖代謝・骨代謝・細胞の分化などを制御し、生体の恒常性維持に重要な働きをすることが知られている。これら核内受容体は単量体として働くものや、ホモダイマーやヘテロダイマーとして働くものが存在している¹⁾。特に、RXR は様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し、パートナー受容体の活性を補助する役割をもっていると考えられている。本研究でターゲットとする NR4A2 は構造的にリガンドポケットがふさがっており、リガンド開発が困難であることが問題となっていた核内受容体である。最近では、リガンドポケットとなる位置以外に物理的に化合物が結合して転写活性に影響をおよぼすという報告²⁾も一部で出ているが、まだまだ解析が必要な段階である。今回はこの核内受容体 NR4A2/RXR がその分化誘導に関わっている制御性 T 細胞と呼ばれる過剰となった免疫反応を抑制する免疫細胞である³⁾。制御性 T 細胞は自己免疫疾患やアレルギー反応などを抑制する効果があり、この細胞の割合を増やすことで食物アレルギーの予防・治療に繋がることが期待される。そこで、

RXR と NR4A2 のヘテロダイマーとしての活性を指標として、リガンド探索をおこない、これまでにそのリガンドとして honokiol とプレニルフラボノイドを見出してきたことから、その中でも honokiol に着目し、ヘテロダイマー選択性の検討や副作用の有無、制御性 T 細胞への分化促進効果と食物アレルギー改善への有効性の評価をおこなうことを目的としている。

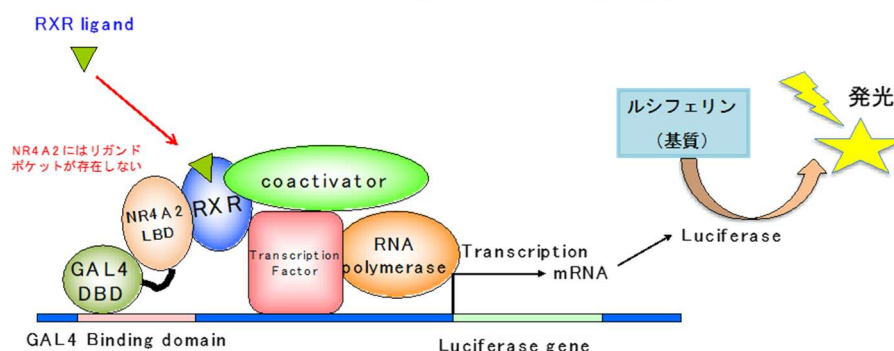
研究計画及び研究手法

① 核内受容体ヘテロダイマー活性化評価系の作成

ヘテロダイマー特異的な活性化を評価するため、酵母由来の GAL4 結合配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドと GAL4 の DNA 結合ドメインを融合タンパクとして発現する各種核内受容体リガンドバインディングドメインの発現プラスミドを新たに作成した。ここでは、NR4A2、RAR、LXR、FXR、VDR、RXR などの GAL4 融合タンパク発現プラスミドを作成するとともに、そのコントロールとなる GAL4 の DNA 結合ドメインのみを発現するプラスミドも作成した。それらとレポータープラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、それぞれ化合物の活性化を評価した。また、GAL4 融合タンパクとして遺伝子導入する核内受容体とともに、ヘテロダイマーを形成する核内受容体の RXR α または RXR γ の全長配列を同時に遺伝子導入し、ヘテロダイマー形成によりその転写活性化が増強されるかについても評価した。その他に、他の核内受容体と RXR のヘテロダイマー選択性の評価をおこなうことを目的に、FLAG タグを融合させた様々な核内受容体全長配列をクローニングし、免疫沈降法 (Co-IP 法) を利用した化合物によるヘテロダイマー形成作

図 1 NR4A2/RXRヘテロダイマーの評価系

ヘテロダイマー活性化検出実験



用の選択性の評価を検討していたが、タンパクの抽出方法や核内受容体の発現量の調整、選択性を評価するために揃えるべき条件を整えることが難しいため、断念することにした。

② 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 (Foxp3-EGFP 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 ϵ 抗体、CD28 抗体、TGF β 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 Foxp3-EGFP 発現細胞 (制御性 T 細胞細胞) の割合で評価した。

③ Honokiol の投与による副作用の有無の検討

Honokiol は核内受容体 RXR を介して、様々な核内受容体とのヘテロダイマーを活性化することをこれまでに報告してきている。その中でも、脂質代謝関連の遺伝子発現を制御する核内受容体 LXR とのヘテロダイマー活性化により、肝臓における SREBP-1c の発現を誘導し、さらにその SREBP-1c が脂肪酸合成酵素の FAS の遺伝子発現を誘導することによって、肝臓での脂肪酸合成を活性化させる結果として、脂肪肝が生じることがおおきな副作用として知られている⁴⁾。そこで、C57BL6J マウスに 7 日間腹腔内投与することによって、LXR/RXR ヘテロダイマーを介した副作用である肝臓での脂肪酸合成活性化による脂肪肝の発症が生じるかの検討をおこなった。コントロール群、LXR アゴニストである T0901317 を 20 mg/kg/day 投与群、honokiol を 40 mg/kg/day 投与群、または両方を同時投与群の 4 群について 7 日後の肝臓を摘出し、肝重量を測定するとともに肝組織の全体写真を撮影した。脂肪肝が発症すると組織の色が白くなり、肝重量も増加する。さらに、肝組織の切片を作製し、HE 染色をおこなった。

④ Honokiol の経口投与による脾臓中の制御性 T 細胞割合変化の検討

C57BL6J マウスに 5 日間経口投与し、脾臓中に存在する制御性 T 細胞の割合がどのように変化するかの検討を行った。コントロール群および honokiol を 20 mg/kg/day 投与群について 5 日後の

脾臓を摘出し、フローサイトメーターを用いて、ヘルパーT細胞中の制御性T細胞の割合を評価した。

⑤ 食物アレルギーモデルへの honokiol の経口投与効果の解析

これまでの実験で使用してきたマウスである C57BL6J マウスを由来とする Foxp3-GFP マウスを用いて、OVA 食物アレルギーモデルに対する有効性の検討をおこなった。OVA 100 µg と alum 4 mg を混合したものを 0 日目と 7 日目に腹腔内投与し、honokiol は 20 mg/kg/day となるように 10 日目から 1 日おきに 20 日目までの 6 回経口投与をおこなった。その後、OVA 50 mg/匹を 22 日目より毎日経口投与し、投与後 1 時間の下痢症状を観察した。1 週間経過したところで解剖をおこない、脾臓・腸間膜リンパ節中の制御性 T 細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。また、アレルギーによる炎症で大腸の短縮などが起きていないのかも確認した。

結果と考察

① 核内受容体ヘテロダイマー活性化評価系の作成と化合物のヘテロダイマー活性化評価

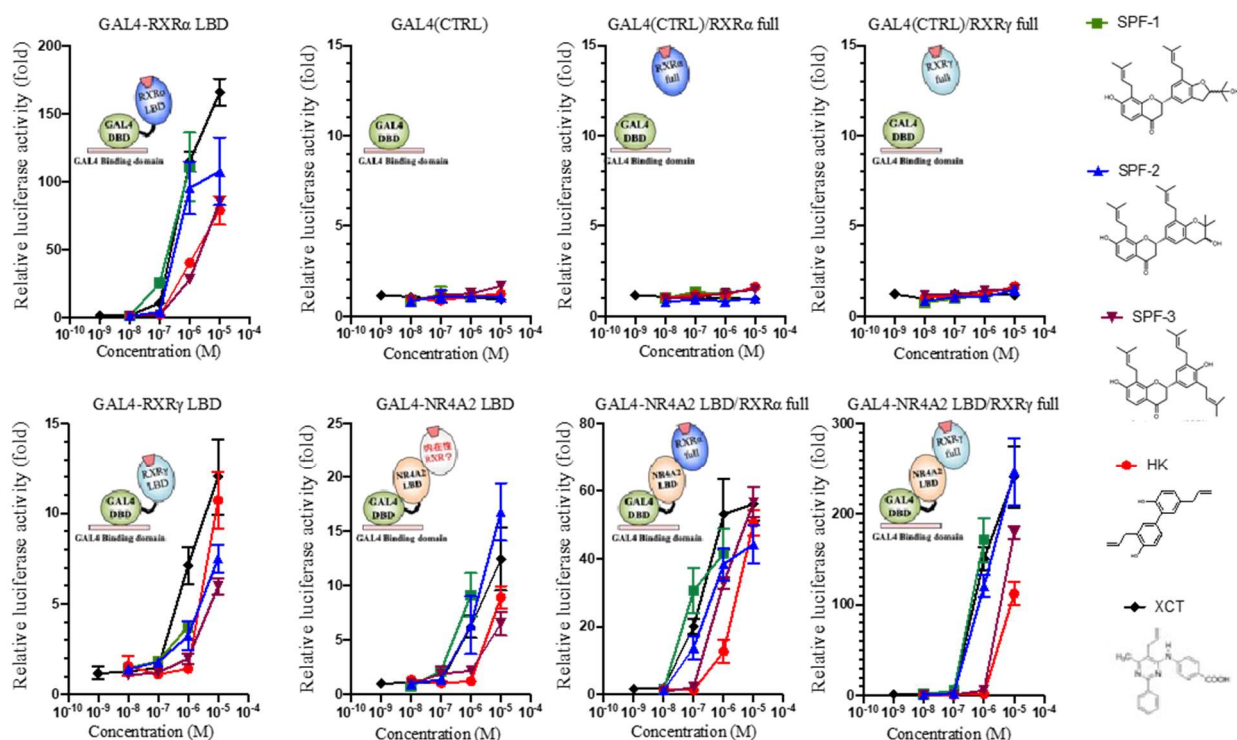
GAL4 融合タンパクとして核内受容体を作成し、そのリガンド活性を評価した結果、既知リガンドの濃度依存的に活性化が検出され、十分な検出感度を得られた核内受容体としては RXR α 、RXR γ 、NR4A2 があり、その他の RAR、LXR、FXR、VDR については検出感度として十分なものとして現段階では作成することができなかった。プレニルフラボノイド 3 種(SPF-1,2,3)および honokiol は GAL4-NR4A2 のアッセイで濃度依存的な転写活性を示し、GAL4-NR4A2 と RXR α または RXR γ が共存すると転写活性が増強される結果が得られた。特に RXR γ と共存時に強い転写活性が確認された。GAL4-NR4A2 単独での活性化に関しては、HEK293 細胞内の内在性 RXR が少なからず存在していることにより、リガンドポケットがふさがっている GAL4-NR4A2 においても転写活性が確認されたのではないかというのが 1 つの可能性であり、また他の研究者の論文報告では、リガンドポケットが存在しないが、タンパクのどこかに化合物が結合することで転写活性化が生じるといった化合物も存在すると報告している。これらの 2 つの可能性が考えられるが、GAL4-RXR に対するアッセイ系でも転写活性化が起きていることから、RXR にリガンドとして結合していることは明

らかであり、内在性の RXR とヘテロダイマーを形成したと考えるのが妥当である。さらに、GAL4 タンパクに NR4A2 を融合していない状態では、RXR を共存させても転写活性は確認されないことから、NR4A2 を介してこれら 4 つの化合物が転写活性化誘導していることが証明された。

ヘテロダイマーの選択性の評価をおこなうことを目的として、NR4A2 以外の核内受容体 (RAR や LXR など) についても、そのリガンドバインディングドメインと GAL4 融合タンパクを発現するプラスミドを作成したが、既知のアゴニストを用いた時に検出されるルシフェラーゼ活性の最大値が低く、検出感度が悪いため NR4A2 と同様の評価系を使用することができなかった。ただし、過去の RXR リガンドとしての評価を各ヘテロダイマーのターゲット遺伝子発現を指標として調べたことがあり⁵⁾、同じヘテロダイマーを介して誘導されるターゲット遺伝子でも、遺伝子ごとにリガンドによる選択性も見られるような結果もあるため、実際の評価系として副作用となるものが生じるか確認する必要があった。

図2 NR4A2/RXRヘテロダイマーの活性化試験結果

プレニルフラボノイド(SPF1,2,3)およびhonokiol(HK)のNR4A2/RXRヘテロダイマー活性化を評価した。

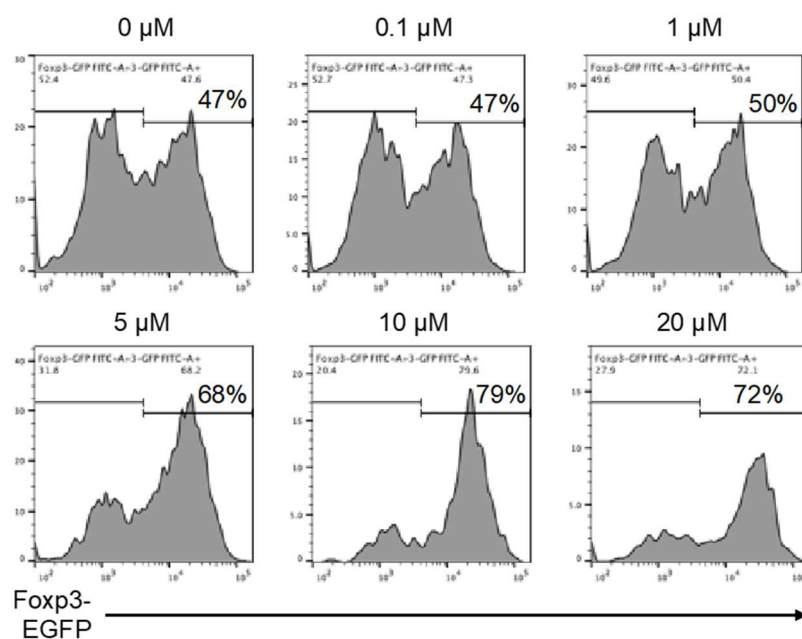


SPF-1,2,3およびHKはNR4A2/RXRヘテロダイマー活性化作用を示した。

② ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化制御実験

Foxp3-GFP マウスの脾臓からナイーブヘルパーT 細胞を精製し、CD3 ϵ 抗体と CD28 抗体で刺激するところに TGF β を加えることにより制御性 T 細胞への分化誘導条件となる。そこへ各種化合物を共存させることにより分化誘導におよぼす影響を検討し、解析はフローサイトメーターを用いて、蛍光タンパク GFP の発現細胞を制御性 T 細胞としてその分化割合を評価した。その結果、honokiol が特に濃度依存的な制御性 T 細胞分化促進作用を示した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたヘテロダイマー活性化試験では、プレニルフラボノイドと比べ活性が低い傾向を示していたが、機能としての制御性 T 細胞分化誘導作用は強い結果となった。これは、制御性 T 細胞分化誘導活性を持つ核内受容体として知られている RAR とのヘテロダイマー活性化による可能性が考えられるとともに、レポーターアッセイでは、GAL4 融合タンパクとしてレポータープラスミド上の GAL4 結合配列に結合させたアッセイ系と、実際に制御性 T 細胞への分化に関与する Foxp3 遺伝子のプロモーター配列上の NR4A2/RXR の結合配列との親和性がリガンド依存的に変化している可能性も考えられる。

図3 Honokiol によるナイーブT細胞から制御性T細胞への分化誘導促進活性 (in vitro)

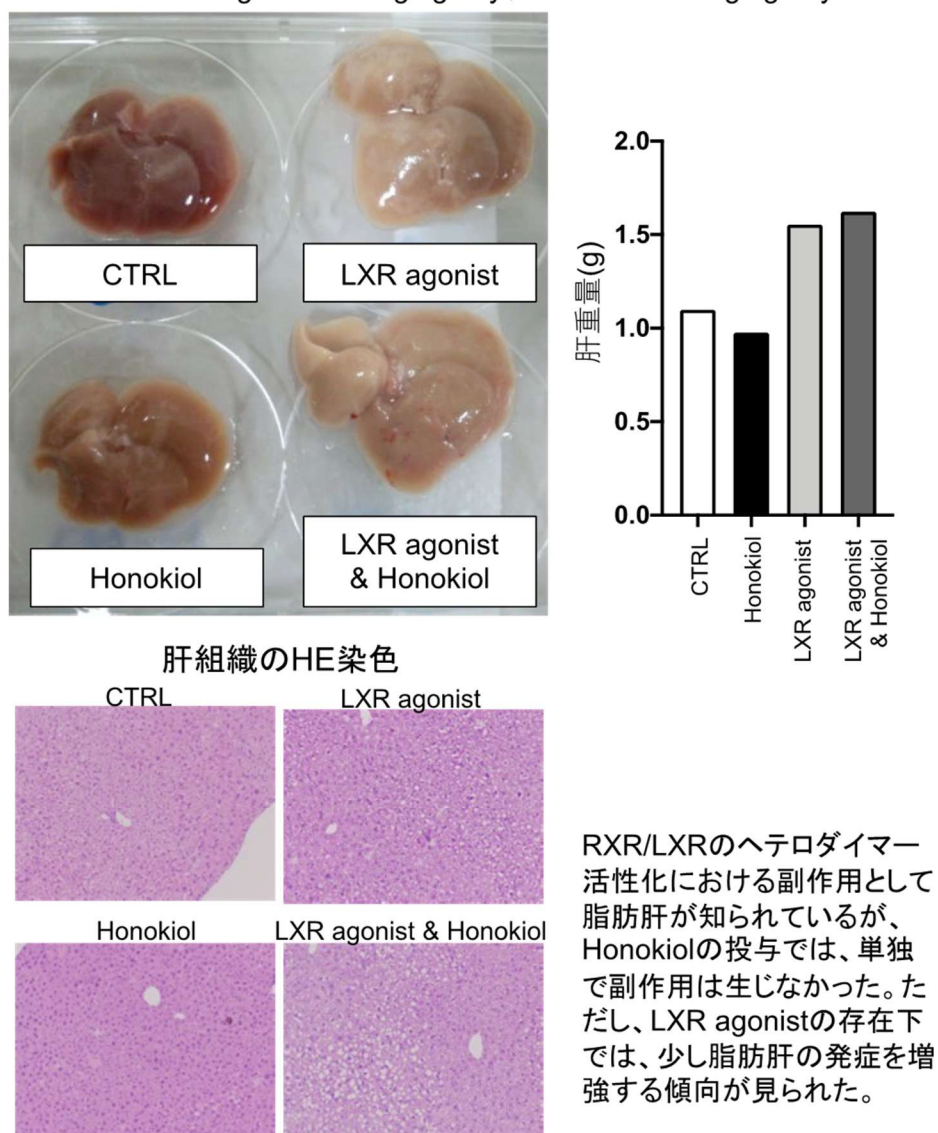


③ Honokiol のマウスへの投与による副作用の有無の検討

C57BL6J マウスに LXR アゴニストである T0901317 を 20 mg/kg/day で 7 日間腹腔内投与した結果、肝重量は約 1.5 倍に増加し、肝組織は白くなり、組織切片を HE 染色したものでは脂肪滴の白くできた空胞が確認された。一方で、honokiol を 40 mg/kg/day で 7 日間腹腔内投与した群では、肝重量の増加や脂肪滴の空胞は確認されなかった。さらに、両方の投与をおこなった群では、肝重量のさらなる増化はほとんど確認されず、脂肪滴は少し増加傾向があるようであった。より薬剤の効果がみられる腹腔内投与で実施したが、結果として、honokiol を投与することによる LXR/RXR

図4 Honokiol投与によるLXR/RXR活性化による副作用（脂肪肝）の発症についての検討

マウスに7日間腹腔内投与(i.p)した時の副作用(脂肪肝)発症に関する結果
LXRagonist: 20 mg/kg/day、Honokiol : 40 mg/kg/day



ヘテロダイマー活性化による副作用としての脂肪肝発症はほとんど生じることはなく、大きく有害な作用が問題となることはなさそうであった。これまでの核内受容体研究経験から、生体において最も顕著に確認される副作用が脂肪肝であり、臨床応用へのおおきな障害となることから、この honokiol の投与による副作用として脂肪肝が起きないことが確認されたことは今後の薬剤開発にとっても意義のある結果であった。

④ Honokiol の投与による脾臓中の制御性 T 細胞の割合変化の検討

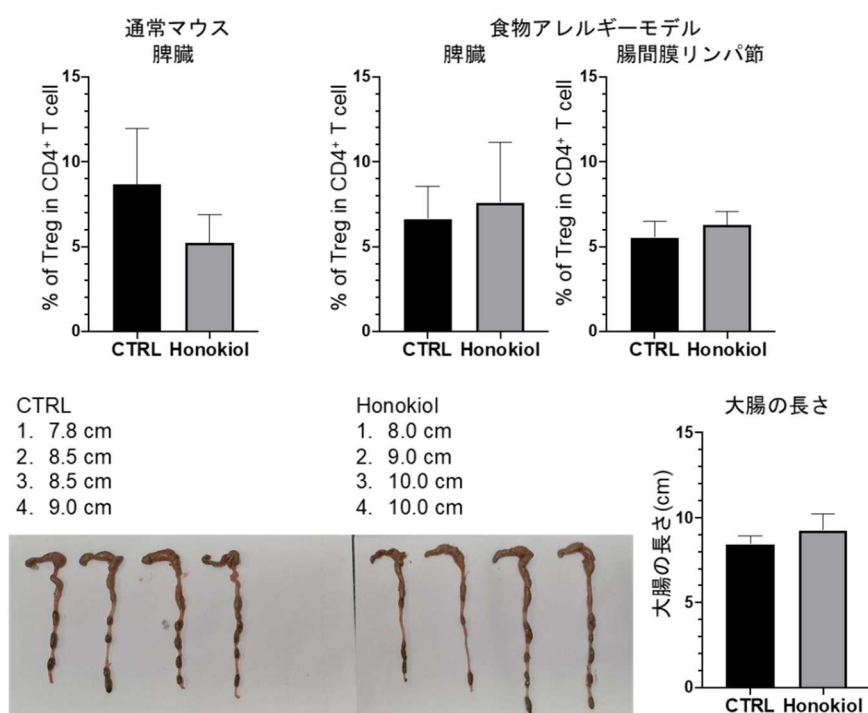
実際の予防・治療をおこなうことを想定し、C57BL6J マウスに honokiol (20 mg/kg/day) を経口投与 5 日間おこなったところ、脾臓におけるヘルパーT 細胞中の制御性 T 細胞の割合は、個体差もあったが予想に反して honokiol 投与群で低くなる傾向が確認された。ただし、この動物実験は食物アレルギーを発症させたものではなく、通常飼育しているマウスに経口投与を 5 日間おこなった時に、大きな割合変化を示すかどうかを確認したものである。制御性 T 細胞の割合が 8.5%から 5%への低下がみられたが、それほど大きな変化ではないと考える。

⑤ 食物アレルギーモデルへの honokiol の経口投与効果の解析

今回の実験では、C57BL6J 系のマウスを利用したこともあり、十分な食物アレルギー症状が確認することができなかった。結果として、大腸の短縮に関してはあまり生じていなかったが、少しコントロール群のほうが短縮している傾向であった。また、脾臓・腸間膜リンパ節での制御性 T 細胞の割合変化に関しては、症状があまり起きていないこともあるのか、個体による差があり、群ごとに平均するとほとんど差がないような結果となってしまった。今回の実験では honokiol の投与期間に関しても OVA を経口投与する期間に関しては中止したこともあり、まだ honokiol の投与タイミングや投与期間に関しては検討をおこなう必要がある。特に、アレルギーモデルとして一般的に使用される Balbc 系のマウスを利用して食物アレルギーの症状をしっかりと起こさせる必要がある。アレルギーの免疫反応がしっかりと起きていない状況に、NR4A2/RXR に作用し制御性 T 細胞への分化促進するような honokiol が投与されても、それほど大きな効果が生じないのかもしれない。ま

た、制御性 T 細胞への分化促進はナイーブな T 細胞に対しての効果を *in vitro* で確認しているの
あり、抗原刺激の存在がない状態では分化誘導に影響を示さない可能性も考えられる。したがって、
OVA の経口投与で症状を確認する際にも honokiol の同じ投与をおこなうほうが効果的である可能
性が示唆される。

図5 食物アレルギーモデルにおける制御性T細胞
の割合変化および大腸の長さ変化



今回の助成期間において、当初予定していた honokiol とプレニルフラボノイドが、RXR に結合
してヘテロダイマーとして直接的に NR4A2 を介して転写活性を示す結果と、制御性 T 細胞の分化
を促進する *in vitro* でのデータは示すことができたが、他のヘテロダイマーとの直接的な結合の強
さなどの比較評価は十分に確認することができなかった。ただしマウスへの honokiol の投与をおこ
ない、LXR/RXR ヘテロダイマーを介した副作用の1つである脂肪肝発症は生じないことが確認で
きた。しかし、食物アレルギーモデルの実施に関しては、症状が十分に検出できなかったこともあ
り、症状が強く出る Balbc 系を用いた再実験が必要である。また動物モデルでの有効性の結果は出
ていないが、*in vitro* における honokiol とプレニルフラボノイドの制御性 T 細胞分化誘導に関する
成果の発表として 3 月末の日本薬学会においてポスター発表をおこなった。

今後の研究活動について

今回の研究結果では、マウスを用いた食物アレルギーモデルで症状としての下痢症状などを確認することができなかった。In vitro での制御性 T 細胞分化誘導活性を評価した T 細胞と揃えることを優先し、C57BL/6 系の Foxp3-GFP マウスでおこなったことが原因であると考えられ、アレルギーモデルとして一般的に使われる Balb/c 系で実施することでより明確な食物アレルギー症状が確認され则认为している。免疫系の感作が強く起きることにより、T 細胞の分化時における honokiol の効果も強く出て、制御性 T 細胞への分化誘導が促進する可能性もあることから、Balb/c 系で食物アレルギー動物実験を再度検討することが必要であると考えている。また、honokiol は RXR を介して様々な核内受容体とヘテロダイマーを活性化することから、腸管での免疫系におけるヘテロダイマー選択性をより詳細に評価することも重要であると考えている。特に、制御性 T 細胞の分化に大きな影響を示す RAR とのヘテロダイマー活性化に対する評価に関して、食事由来の RAR リガンドのレチノイン酸などを阻害しているなどがないのか評価することも必要であると考えている。

今後も食に関する研究を進めていくとともに、制御性 T 細胞を制御するような医薬品・食品開発をおこない、科学的なエビデンスを示すことで食物アレルギーの予防・治療に貢献していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 1995. 83(6):841-50.
- 2) Munoz-Tello P, Lin H, Khan P, de Vera IMS, Kamenecka TM, Kojetin DJ. Assessment of NR4A ligands that directly bind and modulate the orphan nuclear receptor Nurr1. Journal of Medicinal Chemistry. 2020. 63(24):15639-54.
- 3) 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+ T cells. Nature Communications. 2011. 2:269
- 4) Hayashi T, Kotani H, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori

Y, Ignarro LJ. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation with an additional mechanism for its atheroprptection in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014 111(3):1168-73.

- 5) Inoue M, Tanabe H, Nakashima K, Ishida Y, Kotani H. Rexinoids isolated from *Sophora tokinensis* with a gene expression profile distinct from the synthetic rexinoid bexarotene. *Journal of Natural Products*. 2014. 77(7):1670-7.

以上