

学位論文題名

Th1/Th2 バランスに影響を与える

新規ベンゾイミダゾール誘導体の免疫応答修飾作用の研究

学位論文内容の要旨

免疫応答において中心的な役割を担うヘルパーT細胞(Th)は、サイトカインの産生パターンによりタイプ1(Th1)、タイプ2(Th2)の異なる2つのサブセットに分類される。Th1はインターフェロン- γ (IFN- γ)等を産生し、主にウイルス、バクテリアに対する感染防御などの細胞性免疫(Th1反応)に関与する。一方Th2は、インターロイキン4(IL-4)等を産生し、主に抗体産生などの液性免疫(Th2反応)に関与する。生体ではTh1反応とTh2反応は相互制御されている。即ち、IFN- γ はTh1自身の分化を誘導すると共にTh2の分化を抑制し、一方、IL-4はTh2自身の分化を誘導すると共にTh1の分化を抑制する。このようなTh1とTh2の分化/活性化のバランス(Th1/Th2バランス)が正常および病態時の免疫応答を規定するという説は、種々の免疫病を理解する上で基本的な枠組みを与えてきた。しかしながら、このTh1/Th2バランスを修飾する活性を有する経口投与可能な免疫病治療剤は未だ臨床応用されていない。

本博士論文では、経口投与でTh1/Th2バランスを修飾する新規ベンゾイミダゾール誘導体M50367の発見経緯、そのTh2型免疫応答抑制作用と病態改善作用、さらに本化合物の細胞・分子レベルでの作用機序を解析した結果について報告する。

1) 発見経緯

抗原感作マウスの血中IgE濃度上昇に対する抑制作用を指標に数百化合物のin vivoスクリーニングを行い、経口投与で有効性を示すイミダゾキノリン誘導体を見出した。本化合物は静脈内投与では無効であり、活性代謝物の存在が推測されたが、代謝物検索の結果、活性本体である新規ベンゾイミダゾール誘導体M50354が見出された。M50354の経口吸収改善を目指してエステル化を行い、プロドラッグM50367を誘導した。

M50367は、in vivoにおいてTh1サイトカインであるIFN- γ 産生を増強する一方、IL-4、IL-5などのTh2サイトカイン産生を低下させる活性を示した。また、抗原感作による血中IgE濃度上昇および好酸球浸潤といったTh2型免疫応答を抑制する活性を示した。これらの事実は、本化合物が経口投与でTh1/Th2バランスをTh1側にシフトさせる、ユニークな免疫応答修飾剤であることを示していた。

2) Th1/Th2 バランス調節作用と病態改善作用

M50367 は、喘息モデル、アトピー性皮膚炎モデルにおいて、アレルゲンまたはハプテン感作による血中 IgE 濃度上昇を著明に抑制し、喘息モデルと担癌モデルにおいて、それぞれ脾細胞の IFN- γ 産生を増強した。従って、本化合物はマウスの系統や抗原によらず Th1/Th2 バランス調節作用を示すものと考えられた。

喘息モデルにおいては、脾臓細胞の Th1/Th2 産生バランスのみならず炎症部位である肺胞内の Th1/Th2 サイトカイン濃度も Th1 側にシフトさせる活性を有し、その結果、血中 IgE 濃度上昇のみならず、粘液の過剰分泌、好酸球性炎症、気道過敏性といった喘息の病態を改善する作用が認められた。さらに、体重減少・脾臓萎縮が認められない点や、感染防御を担う Th1 型免疫応答を抑制しない点が、対照薬としたステロイド剤とは異なっていた。

3) Th1/Th2 細胞分化への作用

抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス由来の Th 細胞を用いた解析を行った。その結果、①in vitro で M50367 の活性本体である M50354 がナイーブ Th 細胞の Th1/Th2 細胞への分化を Th1 側にシフトさせること、②この作用は抗原提示細胞の有無に関わらず観察されること、③分化の終了した成熟 Th1/Th2 細胞には作用がないこと、④分化誘導初期のナイーブ Th 細胞の増殖および IFN- γ 産生に影響することなく、IL-4 の産生のみを特異的に抑制することが示された。これらの成績より、M50354 がナイーブ Th 細胞に直接作用してその Th2 細胞への分化を抑制する事が証明された。このことは、M50354 のプロドラッグである M50367 が、in vivo で Th1/Th2 バランスを Th1 側にシフトさせて Th2 型免疫応答を抑制させる作用機序を、細胞レベルで説明するものと考えられた。

4) 分子レベルでの作用機序

KOマウスを用いた解析により、本化合物の免疫応答修飾作用は核内受容体の一種であるアリルハイドロカーボン受容体(AhR)を介するものであることが示された。即ち、ナイーブTh細胞のin vitro Th1/Th2分化実験において、同腹の野生型マウスで観察されるM50354のTh2分化抑制作用はAhR KOマウスで消失しており、また抗原感作マウスにおいて、同腹の野生型マウスで観察される血中IgE濃度上昇抑制作用とTh1/Th2サイトカイン産生バランス修飾作用もAhR KOマウスで消失していた。さらに、抗原刺激時にナイーブTh細胞でAhRが誘導発現すること、本化合物がAhRを介してTh2細胞への分化決定因子であるGATA-3の発現を抑制することが示された。これらの成績より、AhRリガンドとしての本化合物の分子レベルでの作用機序が明らかとなった。

5. 今後の展望

本研究を通じてAhRのTh1/Th2細胞分化における新たな生理機能が明らかになった。AhRリガンドを治療薬として臨床応用する上では、GATA-3発現抑制活性のみを選択的に発揮する作用分離型リガンドが望まれる。そのような創薬を実現するために、AhRに結合した新規ベンゾイミダゾール誘導体M50354が如何にしてTh2分化決定因子であるGATA-3の発現を抑制するのか、その機構解明が今後の研究課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正

副 査 教 授 野 村 靖 幸

副 査 助教授 高 橋 和 彦

副 査 助教授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

Th1/Th2 バランスに影響を与える

新規ベンゾイミダゾール誘導体の免疫応答修飾作用の研究

免疫応答において中心的な役割を担うヘルパー T 細胞(Th)は、サイトカインの産生パターンによりタイプ 1 (Th1)、タイプ 2 (Th2)の異なる 2 つのサブセットに分類される。Th1 はインターフェロン- γ (IFN- γ)等を産生し、主にウイルス、バクテリアに対する感染防御などの細胞性免疫 (Th1 反応) に関与する。一方 Th2 は、インターロイキン 4 (IL-4) 等を産生し、主に抗体産生などの液性免疫 (Th2 反応) に関与する。生体では Th1 反応と Th2 反応は相互制御されている。このような Th1 と Th2 の分化/活性化のバランス (Th1/Th2 バランス) が正常および病態時の免疫応答を規定するという説は、種々の免疫病を理解する上で基本的な枠組みを与えてきた。しかしながら、この Th1/Th2 バランスを修飾する活性を有する経口投与可能な免疫疾患治療薬は未だ臨床応用されていない。

本博士論文では、経口投与で Th1/Th2 バランスを修飾する新規ベンゾイミダゾール誘導体 M50367 の Th2 型免疫応答抑制作用と病態改善作用、さらに本化合物の細胞・分子レベルでの作用機序を明らかにした。

1) 発見経緯

抗原感作マウスの血中 IgE 濃度上昇に対する抑制作用を指標に数百化合物の in vivo スクリーニングを行い、経口投与で有効性を示すイミダゾキノリン誘導体を見出した。さらに代謝物検索の結果、活性本体である新規ベンゾイミダゾール誘導体 M50354 が見出した。M50354 の経口吸収改善を目指してエステル化を行い、プロドラッグ M50367 を誘導した。M50367 は、in vivo において Th1 サイトカインである IFN- γ 産生を増強する一方、IL-4 などの Th2 サイトカイン産生を低下させる活性を示した。また、抗原感作による血中 IgE 濃度上昇および好酸球浸潤といった Th2 型免疫応答を抑制する活性を示した。

2) Th1/Th2 バランス調節作用と病態改善作用

M50367 は、喘息モデル、アトピー性皮膚炎モデルにおいて、アレルギーまたはハプテン感作による血中 IgE 濃度上昇を著明に抑制し、喘息モデルと担癌モデルにおいて、それぞれ脾細胞の IFN- γ 産生を増強した。従って、本化合物はマウスの系統や抗原によらず Th1/Th2 バランス調節作用を示すものと考えられた。

喘息モデルにおいては、脾臓細胞の Th1/Th2 産生バランスのみならず炎症部位である肺胞内の Th1/Th2 サイトカイン濃度も Th1 側にシフトさせる活性を有し、その結果、血中 IgE 濃度上昇のみならず、粘液の過剰分泌、好酸球性炎症、気道過敏性といった喘息の病態を改善する作用が認められた。

3) Th1/Th2 細胞分化への作用

抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス由来の Th 細胞を用いた解析を行った。その結果、*in vitro* で M50354 がナイーブ Th 細胞の Th1/Th2 細胞への分化を Th1 側にシフトさせること、この作用は抗原提示細胞の有無に関わらず観察されること、分化後の成熟 Th1/Th2 細胞には作用がないこと、分化誘導初期のナイーブ Th 細胞の増殖および IFN- γ 産生に影響することなく、IL-4 の産生のみを特異的に抑制することが示された。これらの成績より、M50354 がナイーブ Th 細胞に直接作用してその Th2 細胞への分化を抑制する事が証明された。

4) 分子レベルでの作用機序

ナイーブ Th 細胞の *in vitro* Th1/Th2 分化実験において、野生型マウスで観察される M50354 の Th2 分化抑制作用は核内受容体の一種であるアリルハイドロカーボン受容体 (AhR) KO マウスで消失しており、また抗原感作マウスにおいても野生型マウスで観察される血中 IgE 濃度上昇抑制作用と Th1/Th2 サイトカイン産生バランス修飾作用が AhR KO マウスで消失していた。さらに、抗原刺激時にナイーブ Th 細胞で AhR が誘導発現すること、本化合物が AhR を介して Th2 細胞への分化決定因子である GATA-3 の発現を抑制することが示された。

5) 今後の展望

本研究を通じて AhR の Th1/Th2 細胞分化における新たな生理機能が明らかになった。今後、AhR リガンドを免疫疾患治療薬として開発するための重要な手掛かりが得られたものと考えられる。

以上、加藤 穰は精力的に新規免疫治療薬の開発及びそのメカニズム解析を行い、多くの成果を挙げた。これらの業績は加藤 穰に博士(薬学)の学位授与に十分値し、推薦するものである。