

疾患発症シグナルを標的とする花粉症治療戦略の分子基盤解明

大阪大谷大学 薬学部 薬理学講座

西野智穂（研究代表者）

水口博之、福井裕行

1. 諸言

花粉症は国民の30%が罹患する国民病であり、その治療戦略開発が精力的に進められている。骨太方針2018において、アレルギー疾患対策基本指針に基づいた「アレルギー疾患の重症化予防」や「症状軽減に向けた対策」を推進することが閣議決定された。また、花粉症治療薬を医療保険対象外にとの提言もされ、現在の治療薬に変わるセルフメディケーション可能な新規治療戦略の開発が急務である。われわれは、花粉症患者では鼻粘膜ヒスタミンH₁受容体(H1R)遺伝子発現が亢進しており、H1R遺伝子発現シグナルであるPKC δ シグナルの抑制により花粉症症状(くしゃみ・鼻汁)が改善できることを証明した¹⁻³⁾。しかし、抗ヒスタミン薬の効果は部分的で抗ヒスタミン薬が効きにくい患者も存在する。われわれは、第2の花粉症発症シグナルとして、IL-9遺伝子発現シグナルであるNFATシグナルを発見した⁴⁾。両シグナルの同時抑制によりモデル動物において症状が顕著に改善できることから、抗ヒスタミン薬が効きにくい患者ではNFATシグナルが優位になっているのではないかと考えた。また、花粉症患者において、鼻粘膜IL-33遺伝子発現レベルは症状(くしゃみ・鼻汁)の重篤性とは相関しないが、血中好酸球数と正に相関することを見出した⁵⁾。このことから、IL-33遺伝子発現を制御できれば、好酸球増多により惹起される鼻炎の慢性症状や喘息などの症状改善できるのではないかと考えた。このように、症状発症シグナルを標的とする治療戦略は、既存のものとは異なる薬理作用を持つ新規治療戦略となる。本課題では、天然物由来シグナル抑制化合物の作用機序を明らかにすることで、ヒトにおける疾患発症シグナルを標的とする花粉症治療戦略の有効性を明らかにするための分子基盤を形成する。

2. 方法

2.1 RBL-2H3細胞、およびNFATc1、NFATc2過剰発現BHK21細胞の培養

RBL2H3細胞は、10%FBSおよび抗生物質(Antibiotic-Antimycotic Mixed stock solution)を含むMEM培地を用いて、またNFATc1または、NFATc2を過剰発現させたBHK21細胞(広

島大学神沼修教授より供与)、10%FBS および抗生物質を添加した DMEM (high glucose) 培地にて培養した。融合タンパク質発現細胞を選択するために、puromycin を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように添加した。

2.2 リアルタイム RT-PCR 法による IL-9 遺伝子発現量の定量

RNAisoPlus 試薬を用いて total RNA を調整後、total RNA 1.0 μg を用いて逆転写反応を行った。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー及びプローブの配列は以下の通りである。Forward Primer 5'- GAC GAC CCA TCA TCA AAA TGC -3'、Reverse Primer 5'- CTG TGA CAT TCC CTC CTG GAA -3'、probe FAM-TTG TGC CTC CCC ATC CCA TCT GAT-TAMRA。遺伝子発現量は、GAPDH 遺伝子発現量との比として表した。rat GAPDH のプライマー及びプローブは、TaqMan Rodent GAPDH control reagent を用いた。

3.結果

3.1 阿波番茶由来 NFAT シグナル抑制化合物ピロガロールのシグナル抑制機構の解明

これまでに、ピロガロールが NFATc1 および NFATc2 の脱リン酸化および核内移行を抑制することを報告している⁶⁾。ピロガロールの NFAT 脱リン酸化抑制のメカニズムを明らかにするため、NFATc1 および NFATc2 を固定化したビーズを用いたプルダウンアッセイを行い、ピロガロールは NFATc1 とカルシニューリン (CN) の結合を増強した (図 1a)。また、ピロガロールの作用は 3 箇所あるカルシニューリン結合領域⁷⁾ (CNBR-1、CNBR-2、および CNBR-3、図 1b) のうち、CNBR-2 および CNBR-3 を介することが明らかとなった (図 1c)。

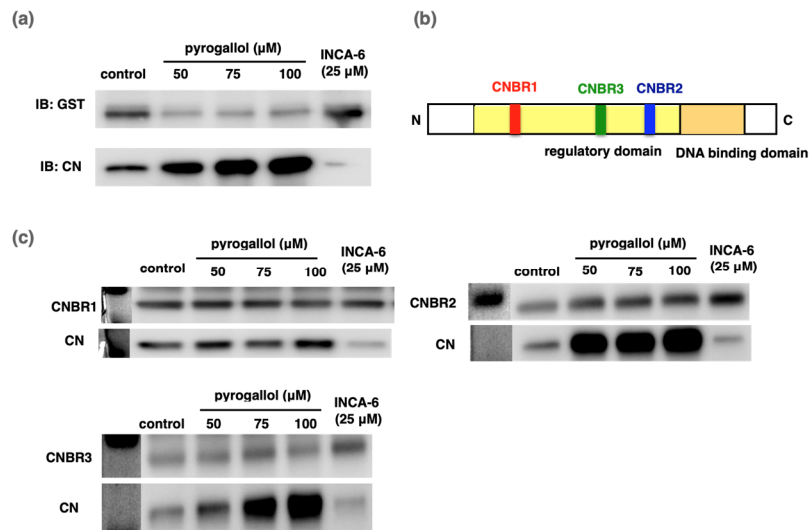


図 1 ピロガロールはカルシニューリンと NFATc1 の結合を強める

(a) NFATc1 の調節部位を固定化したビーズを用いたプルダウンアッセイ。NFATc1 に結合している CN は CN 抗体により検出した。INCA-6 : NFAT シグナル阻害薬。

(b) NFATc1 の CN 結合領域。(c) CN 結合領域を用いたプルダウンアッセイ。

一方、ピロガロールは CN と NFATc2 の結合には影響せず、ピロガロールの CN による NFATc2 脱リン酸化反応の抑制には第 3 のタンパクが関与することが示唆された (図 2)。

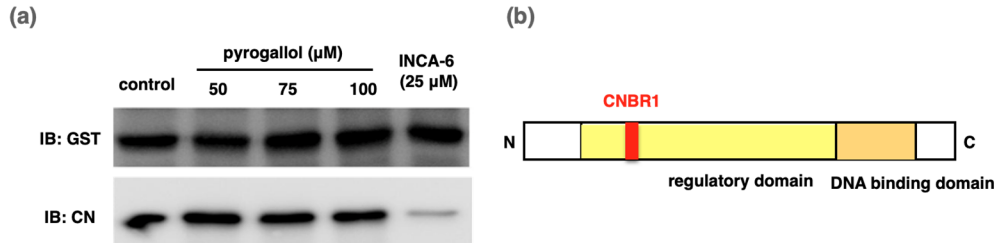


図 2 ピロガロールは NFATc2 とカルシニューリンの結合には影響を与えない
 (a) NFATc2 の調節部位を用いたプルダウンアッセイ。(b) NFATc2 の CN 結合領域。NFATc2 には CNBR-2 および CNBR-3 が存在しない。

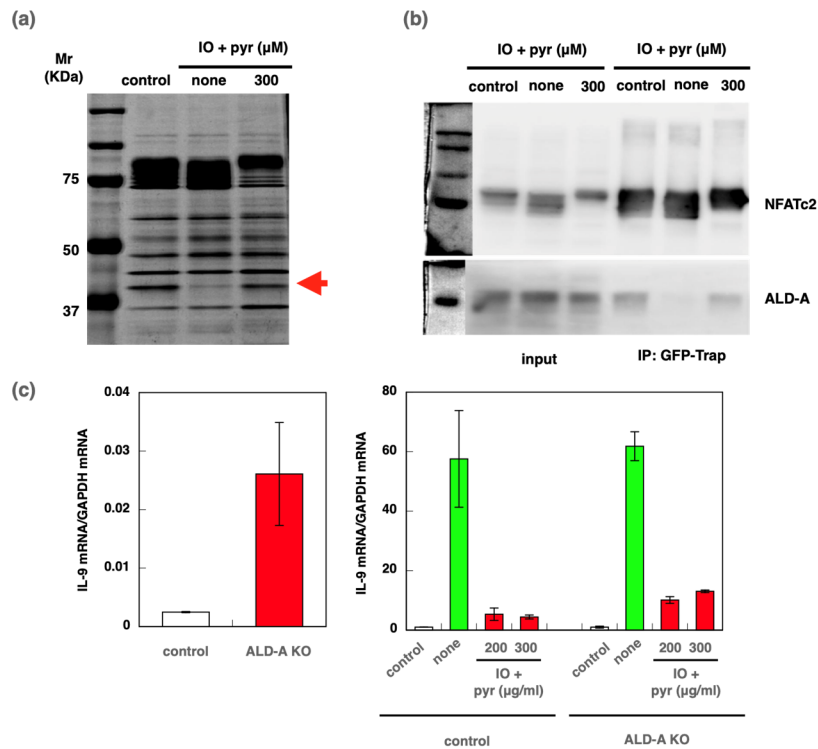


図 3 ピロガロールの NFATc2 脱リン酸化抑制には第 3 のタンパクが関与する
 (a) GFP-NFATc2 を発現させた BHK-21 細胞において GFP 抗体を用いて共免疫沈降し、種々条件下で得られた NFAT 結合タンパクを SDS-PAGE により分離・解析した結果、アルドラーゼ A (ALD-A) が同定された (矢印)。(b) ALD-A 抗体を用いたウエスタンブロット法における種々フラクションを、ALD-A 抗体にて染色した。(c) ピロガロールによる NFAT シグナル抑制における ALD-A の影響。ALD-A 遺伝子をノックアウトした RBL-2H3 細胞における IL-9 遺伝子発現量の変化を real time PCR 法により定量した。IO: イオノマイシン、pyr: ピロガロール。

そこで、ピロガロールにより影響を受ける NFAT 結合タンパクの同定を試みた。GFP-NFATc1 および GFP-NFATc2 を発現させた BHK 細胞を用いて共免疫沈降を行った結果、イオノマイシン刺激により NFATc2 との結合が抑制されるタンパクの存在を見出した。また、NFATc2 とそのタンパクの結合はピロガロールにより回復することが明らかとなった (図 3a)。このタンパクを Lc/Ms/Ms 解析したところ、アルドラーゼ A (ALD-A) であることが明らかとなった。

ALD-A に対する抗体を用いたウエスタンブロットによっても、ALD-A が刺激のない時には NFATc2 を結合しており、イオノマイシン刺激により NFATc2 から解離し、ピロガロール処置により結合が回復することが明らかとなった (図 3b)。さらに、ALD-A 遺伝子をノックダウンした細胞における、ピロガロールのイオノマイシン刺激に伴う IL-9 遺伝子発現亢進への影響を検討した。その結果、ALD-A 遺伝子ノックダウン細胞では、イオノマイシン刺激のない場合においても IL-9 遺伝子発現がコントロールよりも増加し、またイオノマイシン刺激に伴う IL-9 遺伝子発現亢進に対するピロガロールの抑制効果も減弱することが明らかとなった (図 3c)。

次に、没食子酸をカラムに固定化したアフィニティ担体 (図 4a) を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行った。その結果、ピロガロール結合タンパク質として PUF60 (poly(U)-binding-splicing factor) を同定した。

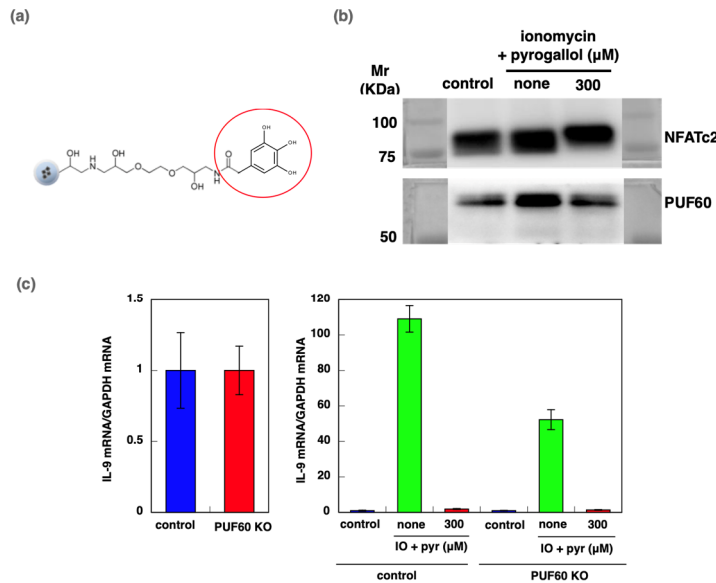


図 4 ピロガロール固定化カラムによるピロガロール結合タンパクの同定

(a) ピロガロール固定化カラム。ピロガロール部分を赤丸で示す。(b) GFP-NFATc2 発現 BHK-21 細胞を用いた免疫沈降実験。抽出液と GFP 抗体を結合させたビーズを混合し、遠心分離によりビーズを沈降させ、NFATc2 に結合した PUF60 を PUF60 抗体により検出した。(c) ピロガロールによる NFAT シグナル抑制における PUF60 の効果。PUF60 遺伝子をノックアウトした RBL-2H3 細胞における IL-9 遺伝子発現量の変化を real time PCR 法により定量した。IO : イオノマイシン、pyr : ピロガロール。

BHK-21 細胞を用いた免疫沈降実験の結果、イオノマイシン刺激により NFATc2 と PUF60 の結合が増加し、ピロガロールはその結合を抑制した (図 4b)。さらに、PUF60 遺伝子をノックアウトした RBL-2H3 細胞を用いて、PUF60 の IL-9 遺伝子発現への影響を検討したところ、PUF60 は刺激のない時の IL-9 遺伝子発現には影響しないが、イオノマイシン刺激に伴う IL-9 遺伝子発現亢進を抑制することが明らかとなった (図 4c)。

4.考察

本研究では、阿波番茶由来 NFAT シグナル抑制化合物ピロガロールの作用機序について明らかにした。ピロガロールは NFAT の脱リン酸化を抑制することで、NFAT シグナルを介する IL-9 遺伝子発現を抑制するが、ピロガロール自身は NFAT の脱リン酸化酵素である CN を阻害しない⁶⁾。そこで、アレルギーに関連の深い NFATc1 および NFATc2 の脱リン酸化に対するピロガロールの影響を検討したところ、ピロガロールは、NFATc1 と CN の結合を直接強めることで、CN の酵素反応のターンオーバーを抑制し、その結果脱リン酸化が抑制されることが示唆された (図 5a)。しかし、ピロガロールは、NFATc2 と CN の結合に対して直接は影響しなかった。ピロガロールは CNBR-2 および CNBR-3 を介して NFATc1 および CN と相互作用しており、NFATc2 にはこの領域が存在しないため影響しなかったと考えられた。また、ピロガロールの NFATc2 脱リン酸化抑制には第 3 のタンパクが関与することが示唆されたことから、このタンパクの同定を試み、ALD-A と PUF60 を同定した。Real-Time PCR の結果から、ALD-A はリン酸化 NFATc2 と結合し、イオノマイシン刺激によりその結合は解除されること、またピロガロールは、NFATc2 と ALD-A との結合に作用し、CN による NFATc2 の脱リン酸化を抑制することが示唆された (図 5b)。一方、PUF60 は、CN による NFATc2 の脱リン酸化反応には影響しないが、PUF60 と脱リン酸化 NFATc2 との結合により IL-9 遺伝子発現を亢進させること、またピロガロールは、NFATc2 と PUF60 の結合を抑制し、IL-9 遺伝子発現を抑制することが示唆された (図 5b)。

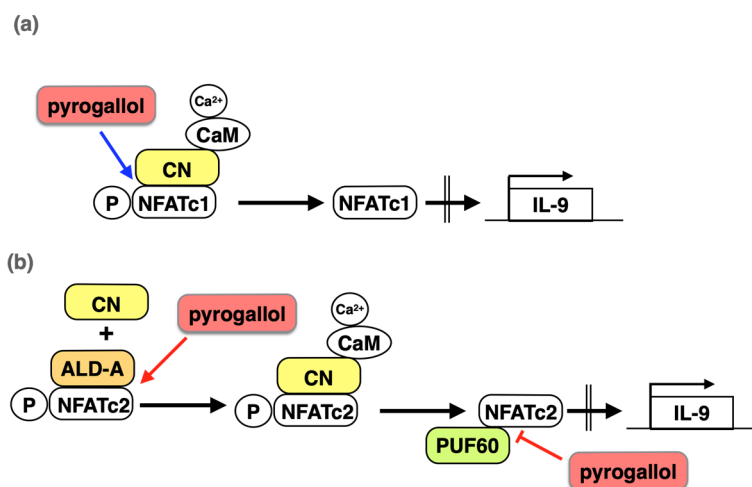


図5 ピロガロールのNFATシグナルを介したIL-9遺伝子発現抑制のメカニズム

(a) ピロガロールのNFATc1脱リン酸化の抑制機構。ピロガロールはNFATc1とカルシニューリン(CN)の結合を強めることで、CNによるNFATc1の脱リン酸化を抑制する。(b) ピロガロールのNFATc2脱リン酸化の抑制機構。ALD-Aはリン酸化NFATc2と結合し、カルシニューリンによる脱リン酸化を抑制する。ピロガロールは、ALD-Aとリン酸化NFATc2の結合を強めることでCNによるNFATc2の脱リン酸化を抑制する。PUF60は、リン酸化NFATc2と結合し、IL-9遺伝子発現を亢進させる。ピロガロールは、NFATc2とPUF60の結合を抑制することで、CNによるNFATc2の脱リン酸化を抑制する。

5. 結語

本研究の結果、阿波番茶由来NFATシグナル抑制化合物ピロガロールは、NFATサブタイプに依存した作用機序により、NFATの脱リン酸化を抑制することが明らかとなった。

6. 文献

- 1) Mizuguchi H, Terao T, Kitai M, Ikeda M, Yoshimura Y, Das AK, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Involvement of Protein Kinase C δ /Extracellular Signal-regulated Kinase/Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Signaling Pathway in Histamine-induced Up-regulation of Histamine H1 Receptor Gene Expression in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 2011;286:30542-30551.
- 2) Nariai Y, Mizuguchi H, Ogasawara T, Nagai H, Sasaki Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Kitamura Y, Nemoto H, Takeda N, Fukui H. Disruption of Heat Shock Protein 90 (Hsp90)-Protein Kinase C δ (PKC δ) Interaction by (-)-Maackiain Suppresses Histamine H1 Receptor Gene Transcription in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 2015;290:27393-27402.
- 3) Kitamura Y, Nakagawa H, Fujii T, Sakoda T, Enomoto T, Mizuguchi H, Fukui H, Takeda N. Effects of antihistamine on up-regulation of histamine H1 receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis induced by controlled cedar pollen challenge in an environmental exposure unit. *J Pharmacol Sci.* 2015;129:183-187.

- 4) Mizuguchi H, Orimoto N, Kadota T, Kominami T, Das AK, Sawada A, Tamada M, Miyagi K, Adachi T, Matsumoto M, Kosaka T, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Suplatast tosilate alleviates nasal symptoms through the suppression of nuclear factor of activated T-cells-mediated IL-9 gene expression in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2016;130:151-158.
- 5) Islam R, Mizuguchi H, Shaha A, Nishida K, Yabumoto M, Ikeda H, et al. Effect of wild grape on the signaling of histamine H1 receptor gene expression responsible for the pathogenesis of allergic rhinitis. *J Med Invest.* 2018;65:242-250.
- 6) Nakano T, Ikeda M, Wakugawa T, Kashiwada Y, Kaminuma O, Kitamura N, et al. Identification of pyrogallol from Awa-tea as an anti-allergic compound that suppresses nasal symptoms and IL-9 gene expression. *J Med Invest.* 2020;67:289-297.
- 7) Kitamura N, Shindo M, Ohtsuka J, Nakamura A, Tanokura M, Hiroi T, et al. Identification of novel inter-acting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. *FASEB J* 2020;34:3197-3208.

7.成果発表

学会発表

- ・水口博之、神沼 修、北村法子、石田達也、北村嘉章、武田憲昭ほか. ピロガロールの NFAT シグナル抑制機構. 第 70 回アレルギー学会学術大会. 横浜 (web 開催) . 2021.
- ・水口博之、中野友寛、西田浩平、伊藤智平、湧川朝治、神沼 修ほか. 花粉症発症シグナルとしての Calcineurin/NFAT シグナル. 第 93 回日本生化学会大会. 横浜 (web 開催) . 2021.