

新規抗炎症化合物の作用機序解明に関する研究

鶴田, 朗人

<https://hdl.handle.net/2324/2236170>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (臨床薬学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 鶴田 朗人

論文題名 : 新規抗炎症化合物の作用機序解明に関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】

炎症はがんや生活習慣病など様々な疾患と密接に関連しており、外因性・内因性侵襲物によって生じる組織細胞の損傷に対する免疫応答が、多岐のシグナルを介して転写因子を活性化することで引き起こされる。炎症を抑制または防止するには、炎症反応を引き起こすリスク因子を阻害または除去することが重要であるが、その病態が非常に複雑であるため、対処的に用いられる既存の抗炎症薬では奏功しない例も少なくない。そのため炎症の根幹を成す新たな機構の解明と、これに基づく抗炎症薬の開発が望まれる。これまでに当研究室では、数千からなる化合物ライブラリーを対象に High throughput screening (HTS)を実施し、新規の抗炎症化合物を発見したが、本化合物の標的分子や抗炎症作用機序は不明である。従って本研究では、新規抗炎症化合物を基軸に新たな炎症機構の解明と、臨床応用に向けた検討として慢性肝炎モデルマウスを対象に薬効解析を行った。

【結果・考察】

1. 新規抗炎症化合物の標的タンパク質を介した新規炎症機構の解明

新規抗炎症化合物の標的タンパク質を同定するために、過去の検討で本化合物が抗炎症作用を示した臓器の1つである肝臓を対象に検討を行った。ビオチン化標識した新規抗炎症化合物と肝臓タンパク質抽出液を反応させてプルダウンアッセイを行った結果、新規抗炎症化合物と結合するタンパク質として Novel inflammatory factor (NIF, 仮称)を同定した。そこで、NIF と炎症反応との関連性を明らかにするために、NIF ノックアウト (KO)細胞を作製して検討を行った。まず、Lipopolysaccharide (LPS)を曝露した未処置(Naive)細胞と NIF KO 細胞に発現する遺伝子についてマイクロアレイ解析を行った結果、NIF KO 細胞では炎症関連遺伝子の発現の低下が認められた。そこで、LPS 曝露により活性が上昇する転写因子に及ぼす NIF KO 影響を、転写活性予測プログラムである weighted Parametric Gene Set Analysis (wPGSA) を用いて解析した結果、NIF は p65 の転写活性を制御することで炎症に寄与することが明らかになった。また、p65 タンパクの転写活性制御における NIF の機能解析を行った結果、NIF タンパク質は核内アセチル CoA 含量を増加させることで、p65 タンパクのアセチル化を促進して、炎症に関連する遺伝子発現量を制御することが示唆された。

2. NIF タンパクの発現概日リズムおよび核内移行機構の解明

p65 の転写活性には明期をピークとする概日リズムが認められる。そこで、p65 の転写活性概日リズムと NIF の発現に相関があるか否か検討を行った。NIF の発現量が多いマウス肝臓を対象に、細胞質画分と核画分に分離抽出して、それぞれの画分における NIF 発現量を測定した。その結果、核画分の NIF タンパクの発現量には明期をピークとする有意な概日リズムが認められた。次に、核移行シグナル(NLS)を有さない NIF タンパク質の核内発現量に概日リズムが認められた現象について、その制御機構の解析を行った。その結果、時計タンパクのひとつである BMAL1 が NIF タンパク質と相互作用して核内 NIF タンパク質発現の概日リズムを制御していることが明らかになった。そこで、*Bmal1* KO マウスから調製した胎児線維芽細胞(MEFs)では核内の NIF タンパク質量および核内アセチル CoA 含量、アセチル化 p65 タンパク発現量がいずれも低値を示し、NIF KO 細胞と類似した結果が認められた。以上の結果から、BMAL1 タンパク質が NIF タンパク質の核移行を制御し、核内のアセチル CoA 含量を調節することで、p65 タンパク質のアセチル化を介した炎症関連遺伝子の発現に影響を及ぼすことが示唆された。

3. ジエチルニトロソアミン(DEN)飲水肝炎モデルマウスを対象とした新規抗炎症化合物誘導体 (NS-3-086) の薬効解析

慢性肝炎から肝硬変、肝細胞がんへの進行が観察できるモデルとして、DEN 飲水肝炎モデルマウスを用い、NS-3-011 の構造を基に細胞膜透過性を改善した誘導体 NS-3-086 を投与して解析した。その結果、DEN 飲水投与により上昇した肝炎マーカーである血清 ALT 活性が NS-3-086 の投与により持続的に抑制された。次に、DEN 飲水投与による肝臓線維化に及ぼす NS-3-086 の薬効を解析した結果、線維化マーカーである Collagen1a2 (*Col1a2*)や Alpha smooth muscle actin (*α -Sma*)の mRNA 発現量やマッソン・トリクローム(MT)染色による線維化領域の染色部位は NS-3-086 の投与により低下した。また、DEN 飲水による肝細胞がんの発症に及ぼす NS-3-086 の薬効を解析したところ、腫瘍塊数および肝細胞がんマーカーである α -fetoprotein (*Afp*) mRNA 発現量の増加は NS-3-086 の投与により抑制された。以上の結果から、NS-3-086 は DEN 飲水肝炎モデルマウスの慢性炎症、肝臓線維化および肝細胞がん発症を抑制し得ることが明らかになった。

炎症はがんや糖尿病など様々な疾患と関連しており、炎症を抑制することは病態の進行を抑制する上で重要であると考えられる。本研究で明らかにした新規炎症機構は、様々な炎症性疾患の発症に関与している可能性も考えられるため、NIF に着目した病態解析を行うことで新規の疾患発症機構の解明に繋がる可能性がある。