

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)

新規抗炎症化合物の作用機序解明に関する研究

薬剤学分野 3PS15029Y 鶴田 朗人

【序論】

世界の平均寿命の延伸に伴い、がんや肥満、糖尿病などの罹患リスクも増加している。これら、疾患を誘引するリスク因子として環境汚染や生活習慣などが挙げられるが、これらリスク因子は生体に慢性的な炎症を引き起こし、上記疾患を含めた様々な生体機能障害を誘発することが知られている。しかしながら、炎症を惹起する要因は多岐にわたるため、その病態は複雑であり既存の抗炎症薬が奏功しない例も少なくなく、新たな炎症機構の解明とそれに基づく抗炎症薬の開発が望まれている。一方、様々な生体機能には概日リズムが認められ、痛み、アレルギー、リウマチなどを例として炎症に伴う病態も概日変動を示す。最近では、不規則な生活習慣と関連した概日リズム障害が炎症を助長することも報告されている。しかしながら、炎症における概日リズム制御機構の全容は未だ明らかにされていない。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。

【方法】

実験動物：5 週齢 ICR 雄性マウス (Kyudo Co. Ltd., Tosu, Japan) を、明暗周期 (明期: 07:00-19:00)、自由摂食摂水条件下で 1 週間飼育した後、各実験に使用した。時刻の表記には Zeitgeber Time (ZT) を用い、ZT0-ZT12 を明期、ZT12-ZT24 (ZT0) を暗期とした。ジエチルニトロソアミン (DEN) および NS-3-086 は飲水投与にて行った。また、すべての動物実験は九州大学における動物実験委員会での承認を受けた後、その指針に従って実施した。

細胞培養：マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 およびマウス繊維芽細胞株 NIH3T3、マウス肝がん由来細胞株 Hepa1-6 は、5% Fetal Bovine Serum (FBS), 0.5% Penicillin, Streptomycin を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

細胞質・核分画：細胞または組織に対して Cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH7.4), 1% (v/v) NP-40, 1 M Hexylene glycol) を加えてホモジナイズし、10 分間氷中で静置後、4°C で 5 分間 遠心 (500 × g) した。上清は細胞質画分とし、沈殿は核画分とした。

プルダウンアッセイ：肝臓組織片を遠心分離法を用いて細胞質画分、核画分に分離したタンパク質抽出液を調製した。抽出液に対してビオチン化標識新規抗炎症化合物を結合させたストレプトアビジン結合マグネットビーズを添加し、4°C 下で終夜反応させた。得られたサンプルは SDS-ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、ネガティブゲル染色法を用いて染色したタンパク質を可視化した。その後目的のタンパク質をゲルより切り出し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いてタンパク質の同定を行った。

アセチル CoA 含量の測定：核の精製は方法の細胞質・核分画の欄に記載した方法で行った。細胞および核からのアセチル CoA の抽出は Bligh & Dyer 法を用いて行った。LC-MS/MS による質量分析には UHPLC Nexera + LCMS-8060 を用い、サンプルの分離には逆相カラムを用いた。内部標準物質としてプロピオニル CoA を用い、移動相は 5 mM 酢酸アンモニウムおよびアセトニトリルを段階的に切り替えることで分離し、定量を行った。

統計解析：独立多群の比較には一元配置分散分析法 (One-way ANOVA) および Tukey-Kramer post-hoc test を用いた。独立二群間の比較には unpaired t-test を用いた。有意水準は 5%以下とした。

【結果・考察】

新規抗炎症化合物が結合する標的タンパク質の同定：新規抗炎症化合物の標的タンパク質を同定するために、誘導体化によって薬効が増強した化合物(NS-3-011)のビオチン標識化誘導体(NS-3-142)および薬効が消失した化合物(NS-3-060)のビオチン標識化誘導体(NS-3-151)を作製した。新規抗炎症化合物が薬効を示した臓器である肝臓のタンパク質抽出サンプルに対してビオチン標識化誘導体を添加してプルダウンアッセイを行った結果、NS-3-151 に特異的に結合するタンパク質が検出された。このタンパク質を LC-MS/MS を用いて解析した結果、Novel inflammatory factor (NIF, 仮称)を同定した (図 1)。

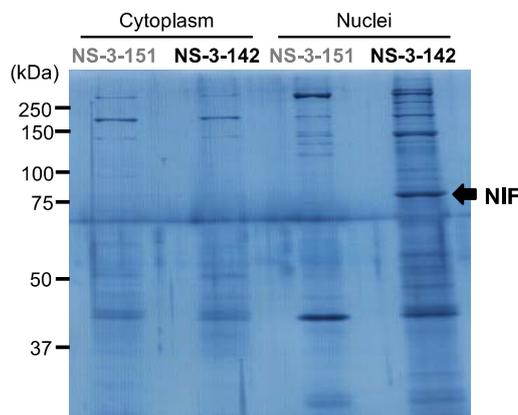


図 1 新規抗炎症化合物結合タンパク質の同定 細胞質と核画分に分画した肝臓組織タンパク質抽出液に対してビオチン化された化合物を添加し、プルダウンアッセイを行った。プルダウンしたサンプルは SDS-PAGE 法を用いて分離しネガティブゲル染色を行った。

炎症反応に及ぼす NIF の影響解析：NIF による炎症制御機構を解析するために、NIF ノックアウト (KO)細胞を作製した。未処置(Naive)細胞および NIF KO 細胞に対して Lipopolysaccharide(LPS)を曝露し、遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析した結果、Naive 細胞と比較して NIF KO 細胞では炎症関連因子の発現が低下していた。そこで、転写因子の活性変化を予測できるプログラムである weighted Parametric Gene Set Analysis (wPGSA)を用いて解析した結果、NIF が p65 の転写活性を制御して炎症反応に寄与することが明らかになった(図 2)。この p65 の転写活性は、リン酸化およびアセチル化によって制御されることが明らかにされている¹。そこで、p65 タンパクのリン酸化およびアセチル化に及ぼす NIF の影響を解析した結果、Control 細胞と比較して NIF ノックダウン(KD)細胞において、p65 タンパクのアセチル化量が低下することが明らかになった。次に、p65 タンパクのア

セチル化に必要なヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)および基質である核内アセチル CoA に着目して解析を行った。その結果、NIF タンパク質は HAT 活性に影響を及ぼさず、核内アセチル CoA 含量を制御することで p65 タンパクのアセチル化を制御することが示唆された。

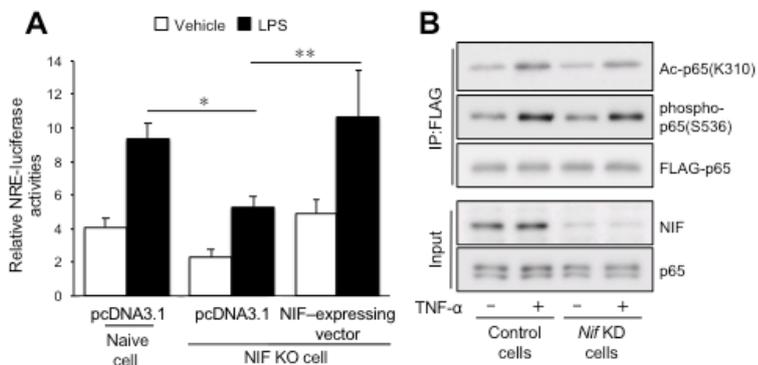


図 2 p65 転写活性に及ぼす NIF の影響

(A) Naive 細胞および NIF KO 細胞に対して p65 が結合する NF- κ B 応答配列(NRE)をプロモーター領域に含んだルシフェラーゼレポーターベクター(NRE-luc)をトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定することで p65 の転写活性を測定した。値は平均値 \pm 標準誤差を示す(n=4)。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 2 群間での比較)。(B) Control または *Nif* siRNA をトランスフェクトした FLAG-p65 および myc-p300 を安定発現 NIH3T3 細胞に対して TNF- α を曝露して、アセチル化およびリン酸化 p65 量を測定した。

NIF 発現概日リズムおよび核内移行機構の解析: 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²。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 タンパクの発現がどのような概日リズムを示すか明らかにするために、マウスを対象に NIF が高発現する臓器を BioGPS を用いて調査したところ肝臓において最も高値を示すことが明らかになった。そこで、正常マウスから 6 時点(ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22)において肝臓を採取し核内および細胞質における NIF タンパクの発現量を測定した結果、核内における NIF タンパクの発現量に有意な概日リズムが認められた(図 3 A)。核移行シグナルを有さない NIF タンパクの核内発現量に概日リズムが認められた現象について、時計遺伝子に着目して解析した結果 BMAL1 タンパクが NIF と結合して核内にリズムカルに輸送することが示唆された(図 3 B)。

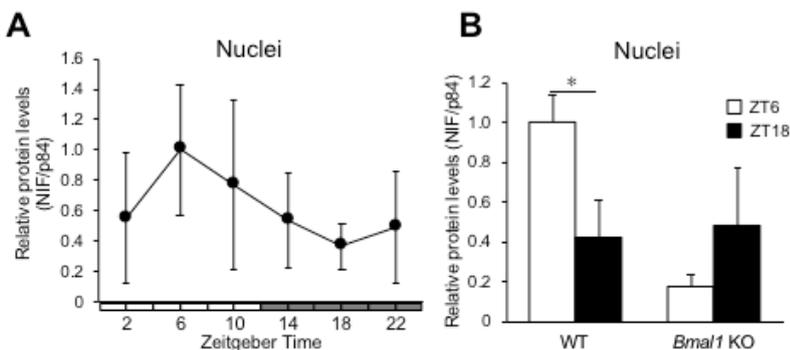


図 3 核内 NIF 発現概日リズムに及ぼす BMAL1 の影響

(A) 正常マウスから 6 時点(ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22)において肝臓を採取し、核を抽出し NIF タンパクの発現量を測定した。値は平均値 \pm 標準誤差を示す(n=5)。(F_{5,24}=2.985, $P=0.031$; ANOVA)。(B) ZT6 および ZT18 に野生型(WT)および *Bmal1* KO マウスから採取した肝臓から核を抽出し、NIF タンパクの核内発現量を測定した。値は平均値 \pm 標準誤差を示す(n=5)。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 2 群間での比較)

核内アセチル CoA 含量およびアセチル化 p65 タンパク発現量に及ぼす Bmal1 KO の影響: 野生型(WT)マウスおよび

Bmal1 KO マウス由来のマウス胎児線維芽細胞(MEFs)における核内 NIF タンパク発現量を測定した結果、WT MEFs と比較して *Bmal1* KO MEFs で核内 NIF タンパクの発現量は低値を示した。さらに、核内アセチル CoA 含量およびアセチル化 p65 発現量を測定したところ、*Bmal1* KO MEFs においていずれも低値を示した。BMAL1 タンパク質は NIF タンパク質の核移行を制御し、核内のアセチル CoA 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。

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：慢性肝炎から肝臓線維化、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対象に、NS-3-086 を投与し薬効解析を行った。その結果、DEN 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 投与により抑制された。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、肝臓線維化マーカーである肝臓中 Collagen1a2(*Colla2*)および Alpha smooth muscle actin(*α -Sma*) mRNA 発現量も NS-3-086 投与によって抑制された。また、DEN 飲水による肝細胞がんの発症に及ぼす NS-3-086 の薬効も解析したところ、DEN により生じた肝細胞がん腫瘍塊数および肝細胞がんマーカーである alpha phetoprotein (*Afp*) mRNA 発現量の増加は NS-3-086 投与により減少した(図 4)。



図 4 DEN 飲水肝炎モデルマウスにおける肝細胞がん発症に及ぼす NS-3-086 の抑制効果 DEN および NS-3-086 を 15 週間持続的に飲水投与した後、肝臓をサンプリングした。▼は腫瘍塊を示す。

【結論】

本研究では、ケミカルバイオロジー技術を用いて新規抗炎症化合物と結合するタンパク質として、NIF を発見した。NIF タンパクは核内のアセチル CoA 含量を調節することで、p65 タンパクのアセチル化量を制御し炎症に関与することを明らかにした。また、NIF タンパクの核内発現量には概日リズムが認められ、時計遺伝子である BMAL1 タンパクと結合することで制御されていることが示唆された。以上の結果より、新規抗炎症化合物は NIF の機能を抑制することによるアセチル化 p65 タンパク質量の低下により生じることが明らかになった。そこで、DEN 飲水肝炎モデルマウスを対象とした NS-3-086 の薬効解析を行った結果、DEN により引き起こされる慢性肝炎、肝臓線維化および肝細胞がんの発症を NS-3-086 が抑制す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が、これら病態の炎症のメカニズムが複雑であるため、未だに有効な抗炎症薬は開発されていない。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。今後、本研究で用いた新規抗炎症化合物の安全性、薬物動態解析また大型動物を用いた実験などを行い、臨床応用を目指したい。

【引用文献】

1. Chen L, et al. *Mol Cell Biol* 25:7966–75. 2005.
2. Artemicheva NM, et al. *Proc Natl Acad Sci* 109:2457–2465. 2012.