

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26110004

研究課題名(和文)細胞死制御化合物の開発と応用

研究課題名(英文)Development and Application of Cell Death Control Molecules

研究代表者

袖岡 幹子(SODEOKA, Mikiko)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：60192142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネクローシスは、古くは物理的障害などで起きる偶発的な細胞死と考えられてきた。しかしながら、近年ネクローシスにも制御機構が存在することが明らかとなり、その解明研究が盛んに行われるようになった。我々は、酸化ストレスで誘導されるネクローシスを阻害するIM化合物IM-54の開発に成功しており、本研究でその特性および疾患との関連性を調べた。その結果、IM-54はアポトーシスには一切影響せず、ネクローシスを選択的に抑制するというユニークな特性が明らかとなった。さらに水溶性アナログIM-17がラット虚血性心疾患モデルで保護効果を示し、IM化合物が抑制するネクローシスが虚血性疾患に関与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、古くは制御されない細胞死として研究対象とされて来なかったネクローシスに新たにスポットライトを当てた点、またその作用機序に独自に開発した阻害剤を用いてアプローチする点に学術的意義がある。さらに、虚血性心疾患を含む心疾患は、現在我が国のがんが続く第2位の死因となっており、IM化合物が虚血性心疾患に治療効果を示したことの社会的意義は高い。IM化合物はその治療薬リードとして期待されると共に、その作用機序解明により新たな治療法の開発にもつながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In general, cell death is classified into two major categories, apoptosis and necrosis, according to its morphological features. Apoptosis is associated with characteristic and regulated morphological changes, but necrosis results in cellular swelling and rupture of cell membrane, which could be induced by accidental physical injury. Therefore, only apoptosis was believed to be regulated, and necrosis had been considered as uncontrolled and accidental cell death. However, recent studies have revealed novel mechanisms for controlling necrosis.

We previously developed indolyImaleimide (IM) derivatives as novel inhibitors for oxidative-stress-induced necrosis. In this study, we have revealed unique cell death inhibition profile of IM derivatives and developed a water-soluble IM derivative IM-17, which showed cardioprotective effects in ischemia-reperfusion injury.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞死 ネクローシス 構造活性相関 有機化学 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体における細胞死の多くはアポトーシスであると考えられてきたが、近年の研究によりアポトーシス以外の多様な細胞死が存在することが明らかとなった。研究開始当時は、それら非アポトーシス細胞死が確認されるものの、その詳細なメカニズムや生体内での役割は未解明の部分が多く残されていた。中でもネクローシスは、外界からの傷害により誘導される偶発的な細胞死として永らく研究対象とされて来なかったが、デスリガンドなどの生体内の細胞死誘導因子が誘導するネクローシス様の細胞死「ネクロプトーシス」が制御機構を持つことが明らかとなるのを契機に、多種多様な制御されたネクローシスの存在とその分子機構や生体の役割に注目が集まるようになった。一方で当研究グループでは、酸化ストレスで誘導されるネクローシス様の細胞死を抑制する化合物 IM-54 の開発に成功していたが、研究開始当初 IM-54 が抑制するネクローシスがどのような分子機構や生体内での役割を持つかが未解明のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では IM-54 が抑制するネクローシスの役割を明らかにし、その分子機構の解明を目的とする。そのために、IM-54 をベースにしたプローブ分子の開発や作用機序解析を行い、並行して作用機序解明のための新しい化学的手法も検討する。さらに、新学術領域内の共同研究として、多種多様なネクローシス様細胞死に関して、新しい細胞死制御化合物の開発も行う。新しい細胞死制御化合物が得られたら、化学的手法を用いてその作用機序解明を進める。

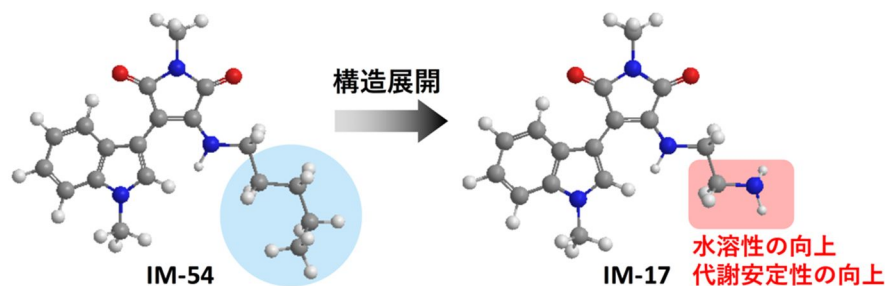
### 3. 研究の方法

本研究では様々な細胞死、特にネクローシス様の細胞死を制御する化合物の化学的な合成と活性評価に基づく構造展開を行い、より高活性な細胞死制御化合物の開発を行う。さらに得られた化合物に関しては、蛍光プローブや結合蛋白質を同定するためのプローブ分子の開発を進め、その結合蛋白質の同定を行う。また、動物実験などで様々な疾患モデルへの応用も検討する。

### 4. 研究成果

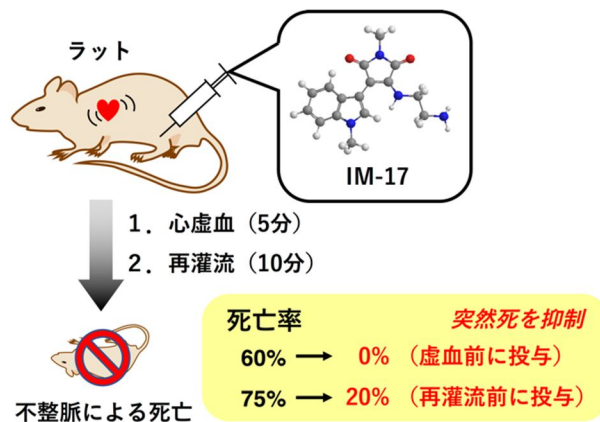
酸化ストレスにより誘導されるネクローシス抑制剤 IM-54 に関しては、その細胞死抑制活性の向上を目指して構造展開を行い、母核構造を変換することで活性を数倍程度向上させた IL 誘導体を開発することに成功した。さらに、IM-54 の細胞死抑制剤としての基本的な特性を明らかにするために様々な細胞死でその抑制活性を調べると共に、IM-54 が抑制するネクローシスに対して既知の阻害剤が抑制効果を示すかどうかを検討した。その結果、IM-54 は抗がん剤で誘導されるアポトーシス、生理的な細胞死誘導因子 Fas リガンドにより誘導されるアポトーシスおよびネクロプトーシス、いずれにも抑制効果を示さなかった。さらに酸化ストレスで誘導されるアポトーシスにも抑制効果を示さなかったことから、IM-54 はネクローシスに対する選択性があることが明らかとなった。一方で、アポトーシスやネクロプトーシスの抑制剤をはじめとする様々な細胞死抑制剤が、IM-54 の抑制するネクローシスに影響を及ぼさず、本ネクローシスがユニークなものであることも明らかとなった。

そこで IM-54 が抑制するネクローシスの生体内での役割を調べるべく、疾患モデルで IM 誘導体の保護効果を検討することとした。その際には IM-54 は水溶性が低く、その動物モデルへの適用が困難であったため、より水溶性の高い誘導体を得るべく種々構造展開を行った。その結果、水溶性が高く IM-54 に匹敵する細胞死抑制活性を示す IM-17 の開発に成功した。さらに肝臓での代謝安定性を調べるべく、肝ミクロゾーム分画中での代謝速度を検討したところ、IM-17 は IM-54 に比べて代謝安定性も向上していることが明らかとなった(下図)。



そこで IM-17 の疾患モデルでの保護効果を検証するために、虚血性心疾患で問題となる虚血再灌流障害での効果を調べた。虚血再灌流障害は動脈硬化などで血管が閉塞し血流が止まったのち(虚血)に、血管を再開通させて血流が再開した際(再灌流)に起きる障害で、その詳細なメカニズムはわかっていないが活性酸素の発生と傷害組織でネクローシスが見られることから、IM-54 が抑制するネクローシスとの関連性が推定された。そこで、ラット摘出心臓を用いて虚血再灌流障害に伴って起きる心機能の低下と心筋細胞の壊死(ネクローシス)を定量し、これに対して IM-17 がどのような効果を示すかを調べた。その結果 IM-17 は虚血再灌流時の心筋壊死および心機能の低下を抑制することが明らかとなった。心筋梗塞時には、虚血再灌流障害により不整脈が誘発され、突然死につながるということが知られている。そこで、同様の突然死をラットで再現

する疾患モデルで IM-17 の効果を調べた (右図)。その結果、IM-17 は虚血再灌流障害で誘発される不整脈を顕著に抑え、さらに突然死も抑制することを明らかにした。また、本保護効果は虚血後再灌流前に IM-17 を投与した場合にも見られ、心筋梗塞により心虚血に陥ったのちでも本化合物が治療効果を示す可能性が示唆された。本結果により、IM 化合物が抑制するネクローシスは虚血再灌流障害との関連性が明らかとなり、その治療薬としての保護効果も見出された。虚血再灌流障害は心臓だけではなく、様々な臓器でも見られることから、他の臓器での保護効果も期待される。



さらに新学術領域内の共同研究として、その他のネクローシス様の細胞死についても制御化合物の構造展開を行った。その結果、好中球が細菌感染時に自身の核クロマチンを Neutrophil Extracellular Traps (NETs) と呼ばれる網のような構造体として細胞外に放出する細胞死 NETosis、およびマクロファージが細菌感染時に起こす Pyroptosis に関して新しい細胞死制御化合物の開発に成功した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Kosuke Dodo, Tadashi Shimizu, Jun Sasamori, Kazuyuki Aihara, Naoki Terayama, Shuhei Nakao, Katsuya Iuchi, Masahiro Takahashi, Mikiko Sodeoka, Indolylmaleimide Derivative IM-17 Shows Cardioprotective Effects in Ischemia-Reperfusion Injury, *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 182-187. DOI:10.1021/acsmchemlett.7b00454. (査読有)
2. Eisuke Ota, Kazuteru Usui, Kana Onuma, Hiroyuki Koshino, Shigeru Nishiyama, Go Hirai, Mikiko Sodeoka, Thienyl-substituted -Ketoamide: A Less Hydrophobic Reactive Group for Photo-Affinity Labeling, *ACS Chem Biol.* **2018**, *13*, 876-880. DOI:10.1021/acscmbio.7b00988. (査読有)
3. 中尾周平, 鬮鬮孝介, 袖岡幹子, 虚血再灌流障害の細胞障害機序とその対策, *Coronary Intervention*, 2018, *14(6)*, 27-33. (査読無)
4. Satoshi Yotsumoto, Yuito Muroi, Tatsuya Chiba, Rio Ohmura, Maki Yoneyama, Megumi Magarisawa, Kosuke Dodo, Naoki Terayama, Mikiko Sodeoka, Ryohei Aoyagi, Makoto Arita, Satoko Arakawa, Shigeomi Shimizu, Masato Tanaka, Hyperoxidation of Ether-Linked Phospholipids Accelerates Neutrophil Extracellular Trap Formation, *Sci. Rep.* **2017**, *7(1)*, 16026. DOI:10.1038/s41598-017-15668-z. (査読有)
5. Kosuke Chiba, Miwako Asanuma, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Takao Yamaguchi, Specific Fluorescence Labeling of Target Protein by Using Ligand-4-Azidophthalimide Conjugate, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8751-8754. DOI:10.1248/cpb.c17-00546. (査読有)
6. Toshiaki Hosaka, Masateru Okazaki, Tomomi Kimura-Someya, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Kaori Ito, Shigeyuki Yokoyama, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Mikako Shirouzu, Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1, *Protein Science* **2017**, *26*, 1749-1758. DOI:10.1002/pro.3211. (査読有)
7. Kosuke Dodo, Kenji Hayamizu, Tadashi Shimizu, Mikiko Sodeoka, Structure-activity relationship study of 3-amino-2-indolylactam derivatives: Development of inhibitors of oxidative stress-induced necrosis, *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 886-898. DOI:10.1248/cpb.c16-00259. (査読有)
8. Yuta Suzuki, Yuito Tanaka, Shun-ichi Nakano, Kosuke Dodo, Natsumi Yoda, Ken-ichi Shinohara, Kazuko Kita, Atsushi Kaneda, Mikiko Sodeoka, Yasumasa Hamada, and Tetsuhiro Nemoto, A Platinum-Catalyzed Friedel-Crafts-Type C-H Coupling-Allylic Amination Cascade to Synthesize 3,4-Fused Tricyclic Indoles, *Chem. Eur. J.* **2016**,

22, 4418-4421. DOI:10.1002/chem.201600375. (査読有)

9. 閻闡孝介, 袖岡幹子, 酸化ストレスによるネクローシス選択的阻害剤-細胞死研究への阻害剤の活用, 実験医学増刊, 2016, 34, 1055-1062. (査読無)
10. Jun Ando, Masanao Kinoshita, Jin Cui, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Katsumasa Fujita, Michio Murata, Mikiko Sodeoka, Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2015**, 112, 4558-4563. DOI:10.1073/pnas.1418088112. (査読有)
11. Masateru Okazaki, Katsue Kurabayashi, Miwako Asanuma, Yohei Saito, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, VDAC3 gating is activated by suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and the bottom of the pore, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, 1848, 3188-3196. DOI:10.1016/j.bbame.2015.09.017. (査読有)
12. Ayako Miyazaki, Miwako Asanuma, Kosuke Dodo, Hiromichi Egami, Mikiko Sodeoka, A "Catch-and-Release" Protocol for Alkyne-Tagged Molecules Based on a Resin-Bound Cobalt Complex for Peptide Enrichment in Aqueous Media, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 8116-8128. DOI:10.1002/chem.201400056. (査読有)

[学会発表](計 29 件)

1. Mikiko Sodeoka, Alkyne-Tag Raman Imaging, 2019 Queenstown Molecular Biology Meetings in Shanghai, Shanghai, China (2019).
2. Mikiko Sodeoka, New Functional Group for Photoaffinity Labeling, Asian Chemical Biology Initiative 2019 Yangon Meeting, Yangon, Myanmar (2019).
3. 中尾周平, 寺山直樹, 閻闡孝介, 清水忠, 井内勝哉, 高橋昌弘, 袖岡幹子, インドリルマレイミド誘導体 IM-17 の開発と虚血再灌流障害モデルにおける効果、第 36 回メディスナルケミストリーシンポジウム、京都 (2018)
4. 閻闡孝介、ネクローシス抑制化合物の開発と虚血性心疾患モデルへの適用、第 27 回日本 Cell Death 学会学術集会、京都 (2018)
5. Kosuke Dodo and Mikiko Sodeoka, Development and Therapeutic Application of Indolylmaleimide Derivatives: Unique Inhibitors for Oxidative Stress-Induced Necrosis, The 2nd International Conference on Food Nutrition & Safety and Medicinal Chemistry, Tianjin, China (2018).
6. Mikiko Sodeoka, Development of CDC25A/B-selective Inhibitor RE44, Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery, Tokyo, Japan (2018).
7. Mikiko Sodeoka, Alkyne-Tag Raman Imaging, The 3rd A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub, Jeju, Korea (2018).
8. 袖岡幹子、ケミカルプローブ：化学から生命科学へ、第 31 回理化学研究所と産業界との交流会、東京 (2018)
9. 閻闡孝介、酸化ストレスにより誘導されるネクローシスの抑制剤開発と虚血性疾患への応用、日本薬学会第 138 年会、金沢、(2018)
10. Mikiko Sodeoka, Transition Metal Catalysis and Chemistry of Bioactive Molecules, Arthur C. Cope Award Symposium at 254th ACS National Meeting, Washington D. C., USA (2017).
11. 袖岡幹子、生命機能解明をめざしたプローブ分子の創製、第 33 回有機合成化学セミナー、札幌市、(2016)
12. 袖岡幹子、有機合成化学から生命科学へのアプローチ、第 25 回千葉大学大学院薬学研究院薬友会生涯教育セミナー、千葉市 (2016)
13. 閻闡孝介、細胞死のメカニズム解明を目指したケミカルバイオロジー研究、金沢大学若手講演会、金沢 (2016)



14. 福島翔、平井剛、佐藤綾人、田村結城、鬮鬮孝介、袖岡幹子、がん細胞選択的な細胞死誘導活性を有する -リノレン酸の機能性誘導体の創製、第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016、船堀 (2016)
15. 袖岡幹子、酸化ストレスにより誘導されるネクローシスへの化学的アプローチ、日本薬学会第 136 年会、横浜 (2016)
16. Kosuke Dodo, Turn-ON fluorescent affinity labeling using small bifunctional O-NBD unit, 2016 Queenstown Molecular Biology Meetings, Shanghai, China (2016).
17. Mikiko Sodeoka, Chemical Approach to Oxidative Stress-induced Necrosis, Asian Chemical Biology Initiative 2016 Jakarta Meeting, Jakarta, Indonesia (2016).
18. 鶴崎慎也、松田道隆、どど孝介、袖岡幹子、宮島篤、田中稔、非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における多様な細胞死の意義、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸 (2015)
19. 鈴木雄太、田中唯人、仲野駿一、どど孝介、袖岡幹子、濱田康正、根本哲宏、触媒的分子内フリーデル・クラフツ型アルキル化反応による新規 3,4 位縮環型三環性インドール骨格合成法の開発と生物活性評価、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、千葉市 (2015)
20. 仲野駿一、どど孝介、袖岡幹子、濱田康正、根本哲宏、スカンジウム触媒によるシクロブタン縮環ヘテロ環類の合成と抗腫瘍活性、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、千葉市 (2015)
21. Mikiko Sodeoka, Chemical Approach to Oxidative Stress-Induced Necrotic Cell Death, Japan Australia Meeting on Cell Death, Melbourne, Australia (2015).
22. 袖岡幹子、細胞死研究から新しいケミカルバイオロジー手法の開発へ、東京薬科大学セミナー、八王子 (2015)
23. どど孝介、ネクローシス制御機構解明を目指したケミカルバイオロジー研究：蛍光 turn-ON 型アフィニティーラベル化法の開発、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島市 (2015)
24. 袖岡幹子、酸化ストレスにより誘導されるネクローシスの制御、第 9 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、横浜 (2015)
25. Kosuke Dodo, Development of Cell Death Control Molecules: Chemical Biology for Cell Death Research, 日本化学会第 95 春季年会アジア国際シンポジウム、船橋 (2015)
26. Moon-Il Kang, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Development of BRET Measurement for VDAC in Living Cells to Evaluate the Oligomerization Status during Cell Death Induction, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜 (2014)
27. どど孝介、酸化ストレス誘導性ネクローシスを制御する化合物の開発とその作用機序、第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会、東京 (2014)
28. 袖岡幹子、細胞死制御化合物の開発、細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明キックオフシンポジウム、東京 (2014)
29. 袖岡幹子、ネクローシス制御分子の開発と作用機序、第 87 回日本生化学会大会、京都 (2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://soc.riken.jp>

プレスリリース

虚血性心疾患に保護効果を示す化合物を開発 - 新しい治療法の開発に期待 -

[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180221\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180221_1/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：どど孝介

ローマ字氏名：DODO, Kosuke

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：開拓研究本部

職名：専任研究員

研究者番号(8桁): 20415243

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。