

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20343

研究課題名(和文) ブロムワレリル尿素の全身性免疫反応症候群に対する治療効果のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanism of the therapeutic effect of bromwarel urea on systemic immune response syndrome

研究代表者

桑原 淳 (Kuwabara, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00512162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：BUは強力な抗炎症作用を有し、NF- κ B活性化と相関しない。BUは、抗炎症効果と関連して2つの異なる作用を有する：LPS誘発STAT1リン酸化およびIRF1発現の弱い阻害、およびミトコンドリア活性の抑制、iATPレベルの低下をもたらす。ロテノンとフィルゴチニブの組み合わせは、BUと同様の程度でNO放出を抑制したので、BUの顕著な抗炎症効果は、JAK1阻害およびiATPの減少の相乗効果に起因し得る。BUのiATPコンテンツおよびJAK1活動への影響のメカニズムは、今後の研究で明らかにされるであろう。

研究成果の概要(英文)：BU has strong anti-inflammatory effects, which are not correlated with NF- κ B activation. BU has two distinct actions in association with anti-inflammatory effects: weak inhibition of LPS-induced STAT1 phosphorylation and IRF1 expression, and suppression of mitochondrial activities, leading to reduced iATP levels. Because the combination of rotenone and filgotinib suppressed NO release to a similar extent as BU, the marked anti-inflammatory effects of BU could be attributable to the synergistic effects of JAK1 inhibition and reduction in iATP. The mechanism behind BU's effects on iATP contents and JAK1 activity remains to be clarified with future research.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、様々なメカニズムを介して広範囲の炎症性疾患の主要な役割を果たしている。特徴的な分化した形態およびマクロファージと類似の性質を有する脳における小膠細胞は、健康および疾患においても重要な役割を果たす可能性がある。炎症反応が組織または器官で起こると、マクロファージおよび小グリア細胞は活性化され、主にその炎症誘発機能を介して疾患の病因に深く関与する。活性化されたマクロファージおよび関連する細胞による炎症反応の適切な制御は、炎症性疾患のより良い結果のために必要である。

Bromovalerylurea (BU; C₆H₁₁BrN₂O₂, CAS: 496-67-3) は 100 年以上前に鎮静剤と催眠剤として開発されました。われわれは、BU が、マクロファージおよび小膠細胞のリポ多糖 (LPS) 誘発性前炎症反応を顕著に抑制することを最近見出した。BU はラット敗血症モデルを改善して動物の生存を改善し、マクロファージによる炎症促進性メディエーターの発現を抑制する。BU は、小膠細胞による一酸化窒素 (NO) 放出を抑制することにより、LPS 処理ニューロン - ミクログリア共培養におけるニューロン死を阻害する。BU は、ラットパーキンソン病モデルにおける黒質緻密部におけるドーパミン作動性ニューロンの喪失を防止し、運動障害の改善をもたらす。

2. 研究の目的

BU の抗炎症作用の根底にある機構はまだ解明されていない。我々の以前の研究では、転写因子 1 (STAT1) およびインターフェロン調節因子 (IRF) 1 および 8 のシグナルトランスドューサーおよび活性化因子の LPS またはインターフェロン惹起リン酸化を BU が抑制することを示した。さらに、BU 抑制 Janus キナーゼ 1 (JAK1) の LPS 誘発リン酸化。しかしながら、JAK1 / STAT1 / IRFs 依存性シグナル伝達経路が BU の唯一の標的であるかどうかはまだ明らかではない。この研究において、BU の抗炎症作用のメカニズムを解明するために、マウス小グリア細胞株 BV2 を使用した。

3. 研究の方法

(1) 定量的リアルタイム RT-PCR (qPCR)
BV2 細胞を、BU またはロテノンの存在下または非存在下で、単独または LPS (1 μg/ml) と共に 60 または 180 分間インキュベートした。インキュベーション後、相補 DNA (cDNA) を調製し、qPCR 分析を他の場所で記載されたように行った。

(2) NO 放出のアッセイ

条件培地は、E2 培地 [10mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (pH7.3) を含有する無血清 DMEM 中

で 24 時間インキュベートした BV2 細胞培養物から得た 1 μg/ml LPS を含む、4.5mg/ml グルコース、5 μg/ml インスリン、5nM 亜セレン酸ナトリウム、5 μg/ml トランスフェリンおよび 0.2mg/ml ウシ血清アルブミン、BU (1~100 μg/ml) または他の薬剤を含まず、グリース反応に基づいて NO 判定を行った。放出された NO レベルを細胞タンパク質含有量で標準化するために、細胞を RIPA 緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM 塩化ナトリウム、0.5% w/v デオキシコール酸ナトリウム、0.1% w/v ドデシル硫酸ナトリウム、1.0% w/v NP-40 代替物)、タンパク質含有量を Pierce BCA タンパク質アッセイ試薬によって決定した。

(3) イムノプロットティング

BV2 細胞を BU、酵素阻害剤またはロテノンと 30 分間プレインキュベートし、続いて LPS を 30 または 180 分間添加した。インキュベーション後、細胞溶解物を、ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 II を含有する Laemmli のサンプル緩衝液を用いて調製した。次いで、溶解物をイムノプロットティングに供した。免疫反応性バンドを、ImageJ 1.43u を用いて濃度測定により分析した。デンストメトリーデータを内部標準 -アクチンに標準化した。

(4) 核分画の準備と核因子- B (NF B) 核への転位の測定

BU2 の有無にかかわらず、LPS と 150 分間インキュベートした後、Nuclear Extract キットを用いて BV2 細胞の核分画を調製した。この分画を、NF B (p65) およびヒストン H2A タンパク質の検出のためのイムノプロットティングに供して、NF B が核内に転座したかどうかを決定した。

(5) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PGV-P2 ベクター (PGV) の MluI-BglII 部位に NF B 応答エレメント (NRE) (5'-GGG AAT TTC CGG GGA CTT TCC GGG AAT TTC CGG GGA CTT TCC GGG AAT TTC C-3') をサブクローニングした-P2-NRE、PGV-P2-NRE の 10 分の 1 のピューロマイシン耐性遺伝子を保有する pCX4pur ベクターと共に BV2 細胞にトランスフェクトした。ピューロマイシン選択によって BV2-PGV-P2-NRE および陰性対照 BV2-PGV-P2 トランスフェクション細胞の安定細胞株を樹立した。細胞を、BU を含むまたは含まない LPS で 24 時間刺激し、ルシフェラーゼ溶解緩衝液中で回収した。ルシフェラーゼ活性は、FlexStation を使用して測定した。

(6) siRNA 媒介遺伝子ノックダウン

siRNA 媒介ノックダウンを、BV2 細胞および腹腔マクロファージ (PM) において行った。JAK1、STAT1、および IRF1 を標的とする siRNA 配列は、以下の通りであった：
JAK1, 5' - CCA UCA UGA GGGACA UAA A - 3' ;
STAT1, 5' - CUA AGA GCC CGA CCC UAU U - 3' ;
IRF1, 5' - GGC AUA UGC AGA UGG ACA U - 3' .
BV2 細胞を、製造者の指示書として Viromer Blue を用いて 20nM の siRNA 二本鎖でトランスフェクトした。細胞を増殖培地中で 24 時間インキュベートし、次いで LPS 誘発炎症反応の分析に供した。対照として、無関係な配列を有する siRNA 二本鎖を使用した。リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 20ml を用いた腹腔洗浄によって、雄 Wistar ラット (8 ~ 9 週齢、平均体重 300g) から PM を単離した。

(7) WST1 アッセイ

BU およびロテノンの細胞代謝速度に対する効果を、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドにより還元されて可溶性ホルマザンを形成する安定なテトラゾリウム塩である WST1 を用いて評価した。BV2 細胞を 10,000 細胞/ウェルで 96 ウェルプレートに播種した。細胞を 30 分間単独で、または BU またはロテノンでプレインキュベートし、続いて LPS および WST-1 を添加した。ホルマザン生成物の吸光度を 450nm で測定し、基準波長を 600nm で測定した。細胞の代謝活性は、OD450-OD600 で表された。

(8) ATP アッセイ

ルシフェラーゼ活性に基づくキット AMERIC-ATP キットを用いて、細胞内 ATP (iATP) 含量を測定した。BV2 細胞を 6cm ディッシュに播種し、30 分間単独または BU またはロテノンでプレインキュベートし、続いて各薬剤の存在下で 2 時間 LPS と共に

インキュベートした。細胞をキットに添付の ATP 抽出液で溶解し測定した。

(9) 急性肺傷害 (ALI) モデル

すべての動物実験は、愛媛大学医学研究科動物実験ガイドラインに従って実施し、愛媛大学動物実験委員会の承認を得た。エシエリヒア・コリを 250ml の脳心臓プロス中で培養した。生理食塩水中の大腸菌懸濁液の濁度を光学濃度 1.0 に調整した。ウイスターラット (8~9 週齢) を麻酔し、16 ゲージの静脈カテーテルを気管に挿入し、0.2ml の大腸菌懸濁液を注入した。ラットを 4 つの群に分けた。メロペネム+ BU (n = 10; 30mg / kg; プロピレングリコール中の 1% 溶液)、対照 (無処置; n = 12)、抗メロペネム単独 (n = 10; 生理食塩水中 30mg / kg メロペネム) およびメロペネム+ Dex (n = 10; 0.5mg / kg; 0.05% プロピレングリコール溶液)。細菌を注入した直後に、薬物を一度皮下注射した。細菌の注入後 48 時間、動物の生存を 12 時間ごとにモニターした。

(10) 肺胞マクロファージ (AM) の調製

PBS 中のエチレンジアミン四酢酸 (0.05% w / v) 10ml を用いた気管支肺胞洗浄により AM を採取した。AM は、E2 培地中の 1 µg/ml LPS による刺激によって活性化された。

(11) 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) による NF- κ B の NRE への結合の評価

核抽出物は、BU または Dex を伴うまたは伴わない LPS と共に 150 分間インキュベートした BV2 細胞からの Nuclear Extract キットを用いて調製した。引き続き、ELISA ベースの TransAM NF- κ B p65 活性化アッセイ (活性モチーフ) をプロトコールに従って使用し、抽出物の NF- κ B DNA 結合活性を測定した。

4. 研究成果

(1)BU は、核への LPS 誘発 NF B 転座および活性化に影響しない。

皮下投与された BU は、ラットの急性肺傷害 (ALI) モデルによる動物の死亡を防止した。超広域スペクトル抗生物質メロペナムと組み合わせた合成グルココルチコイド Dex は、死をわずかに防止した。しかしながら、BU が抗生物質と共に投与された場合、死は完全に防止された。単離ラット AM を LPS で 24 時間処理し、放出された NO を亜硝酸塩として測定した。BU および Dex は NO 放出を同様の程度に抑制した。BU は、AM の核抽出物を用いた ELISA に基づくアッセイによって明らかにされるように、NPS への LPS 誘発 NF B 結合を阻害しなかった。

AM に対する効果とは異なり、BU (100 μ g/ml、 \sim 450 μ M) ではなく Dex (100nM) は、BV2 細胞による LPS 誘発 NO 放出を抑制した。BU は、LPS を BV2 細胞培養物に添加した 180 分後に誘導性 NO 合成酵素 (iNOS)、インターロイキン-1 IL- および IL-6 の mRNA 発現を抑制したことから、BU が LPS 転写レベルで BV2 細胞の前炎症性活性化を誘導した。BU が NF B の核内への転位を抑制するかどうかを決定するために、BV2 細胞培養物に LPS を BU の有無にかかわらず核画分を調製した。BU は、NF B の成分である p65 の LPS 誘発転座を阻害せず、これは以前の報告と一致した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは、BU が NF B 媒介転写に影響しないことを示した。

(2)BU は、LPS 誘導性の p38、MSK1、および STAT1 のリン酸化を抑制した。LPS 処理は、LPS 添加の 30 分以内の BV2 細胞における p38 (SB203580)、MSK1 のリン酸化を増加させた; BU 投与は、リン酸化の増加を部分的に抑制した。LPS は、LPS 添加の 180 分後に STAT1 リン酸化および IRF1 発現を増加させた。BU は、LPS 誘導変化を弱く阻害した。誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の mRNA 発現は、LPS の添加の 60 分後にわずかに増加した。p38 (SB203580; 10 μ M)、MSK1 (SB747651A; 0.5 μ M) および JAK1 (GLPG0634 または filgotinib; 1 μ M) の阻害剤は、iNOS mRNA 発現を弱く抑制した。BU は 12.5-100 μ g/ml で濃度依存的に LPS 誘発 NO 放出を阻害したが、p38 および MSK1 の阻害剤は NO 放出を阻害しなかった。フィルゴニブ (1 μ M) は NO 放出を抑制し、報告された抗炎症効果と一致した。さらに、100 μ M の p38、5 μ M の MSK1 阻害剤および 10 μ M のフィルゴニブが、著しい BV2 細胞変性を引き起こした。

(3)STAT1 のリン酸化と BU の阻害効果

50 μ g/ml の BU およびより低い濃度では STAT1 リン酸化を有意に抑制しなかった。フィロニブは STAT1 のリン酸化をほぼ完全に阻害し、BU の添加は添加物を全く示さなかったが、BU2 (12.5 μ g/ml) とフィルゴニブ (1 μ M) の組み合わせは、BV2 細胞による NO 放出に対する相加的な阻害効果を示した。この結果は、BU が主に STAT1 リン酸化の阻害以外の機構を介して BV2 細胞に対してその抗炎症効果を発揮し得ることを示唆している。

この概念をさらに確認するために、JAK1、STAT1、および IRF1 の発現は、特異的 siRNA を用いて BV2 細胞において抑制された。JAK1 または IRF1 発現がノックダウンされた場合、LPS 誘発 NO 放出は弱く抑制された。STAT1 ノックダウンは NO 放出に影響しなかった。BU は、ノックダウンに関係なく NO 放出を強く抑制した。対照的に、PM 中の JAK1、STAT1、および IRF1 発現のノックダウンは、LPS および/または BU に対する応答性を失わせた。この結果は、BV2 細胞に対する BU の抗炎症効果の主なメカニズムは、LPS 誘発 JAK1 / STAT1 / IRF1 依存性経路の阻害ではないことを示唆している。

(4)BU は、ロテノンと同様の程度で細胞の ATP 合成を抑制した。

ミトコンドリア複合体 I 阻害剤であるロテノンは、一次マウス小グリア細胞および BV2 細胞の活性に影響を及ぼすことが報告されている。低濃度のロテノン (0.2 μ M 未満) は、初代マウス小グリア細胞に対して非毒性である。この研究において、低濃度 (10nM) のロテノンは、BV2 細胞による iNOS および IL-1 の LPS 誘発 mRNA 発現を抑制し、IL-6 mRNA の発現にほとんど影響を与えなかった。ロテノンは、BU よりも LPS 誘発 iNOS タンパク質発現および NO 放出を阻害した。BU とは対照的に、ロテノンは LPS 誘発 STAT1 リン酸化または IRF1 タンパク質発現に影響を与えなかった。BU およびロテノンは、LPS 強化細胞代謝活性を弱く抑制した。BV2 細胞は、BU およびロテノンによって廃止された 2 時間の LPS とのインキュベーションにตอบสนองして、細胞内 ATP (iATP) 含量を増加させた。最後に、BV2 細胞を、LPS の存在下でロテノンと JAK1 阻害剤との組み合わせと共にインキュベートした。この組み合わせは、ロテノンまたはフィロゴニブ単独より有意に強い抑制効果を発揮し、その効果は BU の効果と同等であった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)
Effects of hypnotic bromovalerylurea on microglial BV2 cells
Shun Kawasaki, MD; Naoki Abe, MD; Fumito Ohtake; Afsana Islam, PhD; Mohammed E Choudhury, PhD; Ryo Utsunomiya; Satoshi Kikuchi, MD, PhD; Tasuku Nishihara, MD, PhD; Jun Kuwabara, MD; Hajime Yano, PhD; Yuji Watanabe, MD, PhD; Mayuki Aibiki, MD, PhD; Toshihiro Yorozuya, MD, PhD; Junya Tanaka, M.D., Ph.D.
Journal of Pharmacological Sciences
査読あり アクセプト済
未発行

[学会発表](計2件)
催眠鎮静薬プロムワレリル尿素のラット脳損傷モデルに対する治療効果
阿部尚紀, 川崎俊, 桑原淳, 中西和雄, 西原佑, 越智美緒, 萬家俊博
日本麻酔科学会, 2016.5.27 福岡県福岡市博多区 福岡国際会議場

敗血症モデルラットにおける古典的催眠鎮静薬プロムワレリル尿素の生存率改善効果およびその JAK1 阻害作用
阿部尚紀, 川崎俊, 桑原淳, 西原佑, 萬家俊博
日本病態生理学会, 2015.8.1 愛媛県松山市、愛媛大学城北キャンパス

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 淳 (Kuwabara, Jun)
愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号: 00512162