

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15529

研究課題名(和文) TLRシグナルを介した新奇薬物相互作用によるマクロファージ細胞死の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of macrophage death by drug interaction through Toll-like receptor signaling

研究代表者

小池 敦資 (Koike, Atsushi)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00625725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、自然免疫系の機能低下をもたらす新奇薬物相互作用を起こしうる医薬品の同定とその分子機構の解明を行うことを目的とした。これまでの研究により、TLR4を介したシグナル伝達経路と相互作用する薬物として、アントラサイクリン系薬剤であるドキソルビシンやミトキサントロン、生薬成分のセラストールが、マクロファージに細胞死(アポトーシス)を誘導することを明らかにした。また、アポトーシス阻害剤のzVAD-fmkやBocD-fmkは炎症誘導性細胞死であるネクロプトーシスを誘導することも明らかにした。現在、生体内における、これらの薬物及び化合物が及ぼす相互作用の影響を解析しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物相互作用を引き起こす化合物は数多く知られているが、本研究で明らかにした相互作用を及ぼしうる化合物群はマクロファージなどの自然免疫担当細胞に対して特異的な毒性を示す点で、これまででない画期的なものである。さらに、これらの化合物の組み合わせや分子機構を同定することができれば、免疫機能の低下による重症感染症の予防や、さらに癌細胞の制御にもつながることから、非常に有用な副作用対策ならびに治療効果の向上をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to identify a new drug-drug interaction which causes the inhibition of innate immune response. We demonstrated that celastrol, is a triterpenoid compound isolated from the Chinese Thunder of God vine, and anthracycline antitumor drugs including doxorubicin and mitoxantrone, induced apoptosis in LPS-stimulated macrophages. In addition, we showed that zVAD-fmk- or- BocD-fmk induced cell death occurred by necroptosis through ROS-mediated activation of MLKL and p38 in LPS-stimulated macrophages. Furthermore, we are analyzing the effects of these drugs (compounds) in mice model.

研究分野：生化学

キーワード：マクロファージ 自然免疫 アポトーシス ネクロプトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や癌などの疾患は、高齢になるにつれて有病率が高まるため、高齢者は複数の疾患に罹患していることが多い。つまり、高齢に対しては、多剤併用療法が標準化しており、薬物相互作用による有害事象の発現は健康維持において重要な問題である。近年、日本をはじめ各国において、薬物相互作用の評価に関するガイドラインが制定されており、世界規模で薬物相互作用の回避にむけた取り組みが注目されている。しかし、各国のガイドラインは、免疫系の機能低下に対する相互作用を調べる項目が極めて少ないことが問題である。マクロファージをはじめとする自然免疫担当細胞は、細菌やウイルス等の病原体や体内に発生した癌細胞の除去を行うなど、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。免疫機能の低下は、日和見感染や腫瘍の発症を招きやすいことは、免疫不全症候群からも知られたことである (Rodny *et al. Reproductive Toxicology*, 2011)。したがって、自然免疫系の機能低下をもたらす有害事象は、重篤な感染症の発症といった2次的な有害性として現れる。つまり、この点が自然免疫系に対する薬物相互作用解析が進んでいない理由である。

2. 研究の目的

現在、多剤併用療法が標準化し、薬物相互作用による有害事象を回避することは、重要な課題である。申請者は、マクロファージ活性化経路の一つである Toll 様受容体 (TLR) シグナル経路に作用する薬物同士を併用することによって、急速に細胞死が誘導される現象を見いだした。本現象は、免疫系以外の細胞では見られないことから、免疫系に特異的な薬物相互作用を示唆している。これらの研究成果を踏まえ、本研究では、自然免疫系の機能低下をもたらす新奇薬物相互作用を起こしうる医薬品の同定とその分子機構の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージに細胞死を誘導する薬物相互作用の探索として、マクロファージ活性化剤 (lipopolysaccharide ; LPS) との併用によってマクロファージに細胞死を誘導する化合物の探索を行った。

(2) 細胞死誘導機構の解析として、細胞経路 (アポトーシスやネクローシスなど) の解析およびその分子機構の解析を行った。

(3) 候補化合物の影響についてマウスを用いた解析を開始した。

4. 研究成果

(1) TLR4 を介したシグナル伝達経路と相互作用する薬物として、アントラサイクリン系薬剤であるドキソルピシンやミトキサントロンが、LPS (TLR4 アゴニスト) 存在下でのみマクロファージに細胞死 (アポトーシス) を急速に誘導することを見出した。また、これらの結果より構造活性相関を

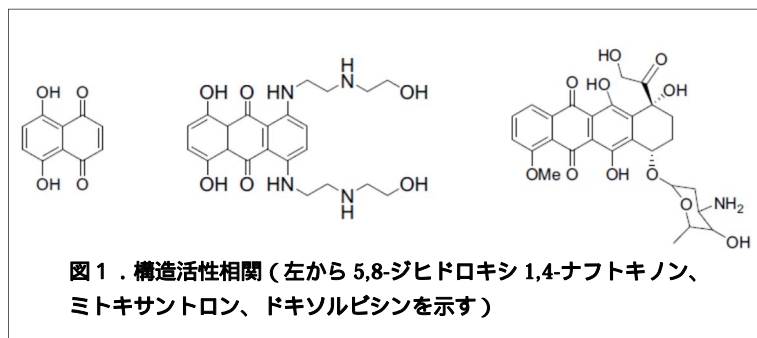


図1. 構造活性相関 (左から5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノン、ミトキサントロン、ドキソルピシンを示す)

を行った結果、図1に示す5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノン骨格を有する化合物が、LPS存在下においてマクロファージのアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらにこの構造とは別にクロツルより単離された生薬成分であるセラストロールにも同様の作用があることを見出した。また、これらの細胞死誘導機構において、MAPKの過剰な活性化の亢進が関与していることを明らかにした。

(2) アポトーシス阻害剤の z-VAD-fmk や BocD-fmk は LPS 存在下において細胞死を誘導することを見出したが、これは先のアポトーシス誘導機構とは異なり、炎症誘導性細胞死であるネクロトーシスを介していることを明らかにした。さらに、本経路には、ネクロトーシスの実行因子である RIPK1 や MLKL を介した経路 (RIPK-MLKL 経路) だけでなく、ストレス応答性 MAPK として知られている p38 MAPK の持続的なリン酸化や ROS の産生が関与していることを明らかにした。現在、生体内における、これらの薬物及び化合物が誘導する相互作用について解析を行っている最中である。

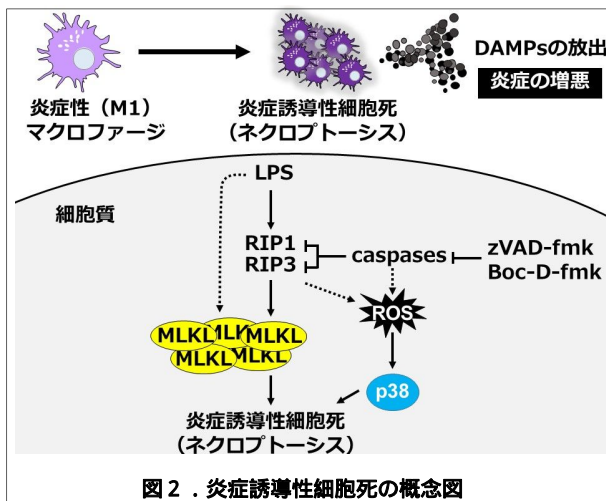


図2 . 炎症誘導性細胞死の概念図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koike Atsushi, Hanatani Miho, Fujimori Ko	4. 巻 380
2. 論文標題 Pan-caspase inhibitors induce necroptosis via ROS-mediated activation of mixed lineage kinase domain-like protein and p38 in classically activated macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 171 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.04.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami Tomoya, Koike Atsushi, Maehara Toko, Hayashi Tetsuya, Fujimori Ko	4. 巻 10
2. 論文標題 Bicarbonate enhances the inflammatory response by activating JAK/STAT signalling in LPS + IFN- γ -stimulated macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Chihiro, Koike Atsushi, Tanaka Reiko, Fujimori Ko	4. 巻 24
2. 論文標題 A Limonoid, 7-Deacetoxy-7-Oxogedunin (CG-1) from Andiroba (<i>Carapa guianensis</i> , Meliaceae) Lowers the Accumulation of Intracellular Lipids in Adipocytes via Suppression of IRS-1/Akt-Mediated Glucose Uptake and a Decrease in GLUT4 Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1668 ~ 1668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24091668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Kawakami, A. Koike, F. Amano	4. 巻 69
2. 論文標題 Induction of different activated phenotypes of mouse peritoneal macrophages grown in different tissue culture media.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 631-642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-017-0073-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Kohama, A. Koike, F. Amano	4. 巻 2
2. 論文標題 Triptolide Induces Cell Damage in Lipopolysaccharide (LPS)-Treated Macrophages in an LPS-Signaling Cascade-Dependent Manner	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cytokine Biology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2576-3881.1000117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K. Kohama, A. Koike, F. Amano	4. 巻 1
2. 論文標題 Cytotoxic effect of triptolide on LPS-treated macrophages through sustained phosphorylation of p38 MAP kinase and apoptosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Biology Review	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.18103/ibr.v1i2.1399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 天野富美夫、小池敦資	4. 巻 27
2. 論文標題 シコニン (shikonin) のマクロファージへの作用を介した新たな免疫調節の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 漢方と最新治療	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 花谷南帆
2. 発表標題 広域型カスパーゼ阻害剤z-VAD-fmkによるLPS活性化マクロファージの細胞死誘導機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花谷南帆
2. 発表標題 広域カスパーゼ阻害剤によるLPS活性化マクロファージの細胞死誘導機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小池敦資
2. 発表標題 カスパーゼ阻害剤による炎症性マクロファージを標的とした細胞死誘導機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻中海斗、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 マクロファージ活性化に及ぼすピタバスタチンの影響
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花谷南帆、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 広域型カスパーゼ阻害剤が活性化マクロファージに特異的に誘導する細胞死の解析
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花谷南帆、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 広域型カスパーゼ阻害剤zVAD-fmkによるLPS活性化マクロファージの細胞死誘導機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻中海斗、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 ピタバスタチンがマクロファージの活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小池敦資、芝野真喜雄、天野富美夫
2. 発表標題 シコニンによるマクロファージを標的とした活性化抑制作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻中海斗、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 マクロファージ活性化に及ぼすピタバスタチンの影響
3. 学会等名 フォーラム2017衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上智也、小池敦資、天野富美夫
2. 発表標題 マクロファージ活性化に及ぼす重炭酸ナトリウム濃度の影響
3. 学会等名 フォーラム2017衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Kawakami, A. Koike, F. Amano
2. 発表標題 Sodium bicarbonate is the factor in culture media that potentially regulates nitric oxide production in a mouse macrophage-like cell line, J774.1 cells, treated with LPS and IFN
3. 学会等名 American Society of Cell Biology annual meeting
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪薬科大学 薬学部 病態生化学研究室 http://pathobiochem.pharm.oups.jp/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考