

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07168

研究課題名(和文) NIP-SNAPsを介したマクロライド系抗菌薬の抗炎症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of anti-inflammatory mechanism of macrolide antibiotics via NIP-SNAPs

研究代表者

山本 聡 (Yamamoto, Soh)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10588479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NIP-SNAPsによるミトコンドリアの品質管理機構及び炎症性サイトカインへの関与を明らかにすることを目的とした。

NIP-SNAPsの一時的な発現抑制によって、ミトコンドリアの機能及び量が優位に減少したのに対し、両者のノックアウト細胞においては差が認められなかった。この結果は炎症性サイトカインIL8の産生と関連していた。以上の結果からマクロライドはNIP-SNAPsに結合し機能を抑制することで、ミトコンドリアの品質管理機構が一時的に破綻、結果として炎症性サイトカインの産生が減少するものと推測された。本研究ではマクロライドの免疫調整効果の分子メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてNIP-SNAPsによるミトコンドリアの品質管理機構が一時的に抑制されることで、炎症性サイトカインの産生量が減少する新規の経路を見出した。

本研究結果は、NIP-SNAPsの機能やミトコンドリアの機能を指標とすることでマクロライド抗菌薬投与時に問題となる耐性菌の出現のリスクを回避するための新規薬剤の開発を促すことが期待できる。加えてミトコンドリアの機能(品質)と炎症性サイトカインIL-8産生が交差する新規の経路を示すことができた。以上より、本研究結果は社会へ還元できると同時に基礎科学などの学術分野に対して大きな貢献ができる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of the immunomodulatory effect of macrolide antibiotics was still unclear. Our group previously showed that macrolide antibiotics bound to NIP-NSAP 1 and NIP-SNAP2 (NIP-SNAPs), a mitochondria protein located on the mitochondrial surface. In addition, it had reported that NIP-SNAPs regulated the mitochondrial quality control of celled mitophagy. We aimed to investigate the relationship between mitophagy by NIP-SNAPs and cytokines expression in this study.

We revealed that knockdown (KD) cells by siRNA transfection had mitochondrial dysfunction and less mitochondrial number. However, no difference was observed in NIP-SNAPs knockout cells. In addition, KD cells secreted less IL-8 by LPS stimulation. These data suggested that macrolides modulate cytokine production through "temporary and modulate" mitochondrial dysfunction, which causes suppression of NIP-SNAPs function by binding of macrolides.

研究分野：自然免疫・基礎医学

キーワード：自然免疫 マクロライド 抗炎症 ミトコンドリア オートファジー マイトファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マクロライド系抗菌薬 (以下マクロライド) は、抗菌活性の他に宿主細胞の免疫反応を調整する抗炎症作用をもつ [Steel, H.C., 2012]。マクロライドは、気道閉塞性疾患や慢性副鼻腔炎に対して有効であり、難治例、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、頻回の急性増悪例に対してはこの抗炎症作用を期待してマクロライドの少量長期投与 (マクロライド療法) が併用される。マクロライド投与により、肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマなどの市中肺炎起因菌のマクロライド耐性化 [Fan, L., 2015] や、咽頭・腸管粘膜常在細菌叢の変化 [Choo, J.M., 2018] といった細菌学的な変化が起こることが臨床問題となっている。

申請者はマクロライドが結合する宿主細胞内タンパク質を同定し、抗炎症作用の分子機構を明らかにすることで、マクロライドが持つ臨床的な問題点を解決し、慢性気道炎症の沈静化に対する新規薬剤が開発できると考えた。

NIP-SNAP 1 (NIP1) 及び 2 (NIP2) (NIP-SNAPs) は 1998 年に発見されたタンパク質 [Seroussi, E., 1998] であるが生理機能の詳細は未だ不明である。申請者は NIP-SNAPs がミトコンドリアの外膜や膜間腔に局在するタンパク質 [BBRC, 2017a] であることや、炎症性サイトカインの産生を調整していることを見出し [BBRC, 2017b]、その研究結果を踏まえ、マクロライドはミトコンドリアに局在している NIP-SNAPs を介して宿主ストレス応答を調整していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

NIP-SNAPs による autophagy を介したミトコンドリアの品質管理機構とマクロライドとの相互作用解析から、マクロライドの抗炎症作用の全貌を解明することである。

3. 研究の方法

(1) NIP-SNAP1, 2 の double knock out (DKO) 細胞の樹立

DKO は気道上皮細胞の Beas-2B 細胞を用いて、NIP1 および NIP2 の sgRNA 配列を組み込んだ px458 および px459 plasmid (Addgene) をトランスフェクションした後、2 日間 puromycin で培養した。その後、限外希釈法にてシングルセルを培養し、各コロニーをスクリーニング、KO 細胞を選択した。また、相補株については全長鎖の NIP1 及び NIP2 を組み込んだ pSMPUW-IRES-Hygro Lentiviral expression plasmid もしくは pSMPUW-IRES-Blasticidin Lentiviral expression plasmid をトランスフェクションし、ブラストサイジン、およびハイグロマイシンで選択し、樹立した。発現量は WB にて確認した。

(2) サイトカイン放出能の測定

Knock down (KD) 細胞は、siRNA を RNAimax (Thermofisher) を用いてトランスフェクションし、48 時間後に種々の測定を行なった。なおし以下に示す siRNA、negative control siRNA, NIPSNAP1 siRNAs (s16166, s16167, s16168), NIPSNAP2 siRNAs (s5614, s5616, s5615) は Thermofisher Scientific 社から購入した。LPS (100 ng/ml) を 2% FBS 含有培地に添加し、6 時間後に回収した。上清中に放出されたサイトカイン IL-8, IL-6 の量は、R&D systems の ELISA kit (human IL-8 DuoSet ELISA; DY208, human IL-6 DuoSet ELISA; DY206) を用いて測定した。

(3) RNA sequence (RNA seq.)

NIP1 及び NIP2 の KO 細胞、DKO 細胞、およびそれらの相補株から total RNA を精製した。RNA seq. は Rhelixa 社に委託し、発現量比較解析をクラスター分類、ヒートマップを作成した。

(4) ミトコンドリア機能の評価

ミトコンドリアの機能評価は、Agilent 社 細胞外フラックスアナライザー XFe96 を用いて測定した。KD 細胞は、siRNA 導入 24 時間後、 2×10^5 細胞ずつ 1 well に接種した。KO 細胞の場合、 1.5×10^5 細胞ずつ接種した。測定は、接種後 24 時間後に行なった。機能評価は、同社のミトストレスキットを用いた。oligomycin (final 1 μ M), FCCP (final 1 μ M), Antimycin A (final 2 μ M) and rotenone (final 2 μ M)を使用した。

4. 研究成果

(1) NIP1 及び NIP2 と炎症生サイトカインの放出能

これまでの申請者の研究によって、KD 細胞では LPS 刺激によって、炎症生サイトカイン IL-8 の産生量が減少することを見いだしていた。本研究では、NIP1 及び NIP2 の DKO 細胞を創出し、炎症生サイトカインの放出能を評価した (Fig. 1)。その結果、DKO 細胞では LPS 刺激による IL-8 産生能に変化が認められなかった。以上の結果から、DKO 細胞において NIP1 及び NIP2 の機能を補うための代替経路が機能し、その結果 KD で認められた炎症生サイトカイン放出能の低下が回復していると推測した。この代替経路を明らかにするために、野生型細胞 (Beas-2B 細胞)、NIP1 及び NIP2 細胞の DKO、DKO 細胞に NIP1 を再発現させた細胞 (DKO-NIP1R)、DKO 細胞に NIP2 を再発現させた細胞 (DKO-NIP2R)、及び DKO 細胞に NIP1 と NIP2 を再発現させた細胞 (DKO-NIP1&2R)を用いて RNA seq.を行なった。その結果、DKO 細胞にて発現が上昇した因子 (=代替因子)の中で、DKO-NIP1&2R 細胞において発現が野生型と同レベルまで減少

する因子を抽出した結果、18 因子に絞ることができた (Fig. 2)。その後、RNA seq.で絞り込んだ 18 因子の発現量をリアルタイム PCR を用いて定量したが、優位な発現量の変化は認められず、代替経路に関わる因子の同定には至らなかった。

(2) ミトコンドリア品質管理と炎症性サイトカインとの関連性

NIP-SNAPs がミトコンドリアの機能維持に関連するのかを明らかにするために、パーキン依存的マイトファジーを誘導する CCCP や Oligomycin/Antimycin (O/A)処理、加えてパーキン非依存的マイトファジーを誘導する DFP 処理を行い、NIP1,2 およびホモログである NIP3 の発現を確認した。その結果、いずれのマイトファジー誘導剤の添加によって NIP1 及び 2 の発現量が減少するのに対し、NIP3 の発現量には変化が認められなかった。またミトコンドリアとの共染色を行うと、NIP1,3 はミトコンドリアに局在していることが明らかとなった (Fig. 3)。以上の結果から、ミトコンドリアのストレス時には NIP1 及び NIP2 が選択的に分解されていることから、既報の通りマイトファジーの受容体として機能することが示された。

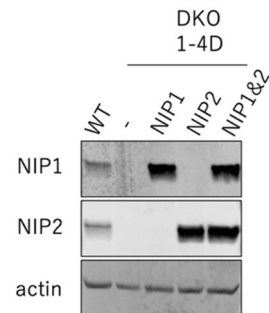


Fig. 1 NIP1 及び NIP2 の KO 細胞の WB

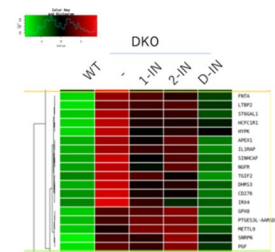


Fig. 2 DKO 細胞、相補株の RNA seq.の結果

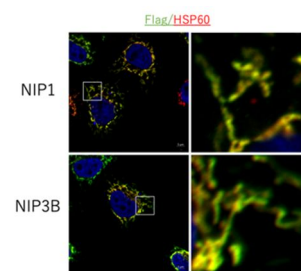


Fig. 3 NIP1 及び NIP3 の共焦点顕微鏡写真

次にミトコンドリアがシグナル経路の中継ハブと機能するかを検証するために、ミトコンドリアストレス時における炎症性サイトカイン IL-8 の産生量を測定した。その結果、CCCP 処理、O/A 処理において IL-8 の産生量の減少が認められた。またこれまでに NIP1 及び NIP2 は p62 タンパク質と結合していることを報告した [BBRC,2017a]。p62 は scaffold タンパク質としての機能のほかに、シグナル伝達にも関与することが p62 の影響を考慮した。p62 の発現を siRNA で KD し、LPS 刺激を行なった結果、興味深いことに IL-8 の産生の増加が認められた。以上のから、NIP1 と NIP2 の KD で炎症性サイトカイン IL-8 の産生量の低下は、p62 依存的ではなくミトコンドリアの機能維持を介することが示唆された。

次に KD と KO 細胞における炎症性サイトカイン能の違いとミトコンドリアの機能との関連性を明らかにするために、ミトコンドリアの量及び機能を測定した。まずリアルタイム PCR を用いて、ミトコンドリアの DNA (mtDNA)量を測定した (Fig. 4)。NIP1,2 の KD において mtDNA の量が低下していた。更にミトコンドリアタンパク質を WB にて確認すると cox2, cox4, tomm20 の発現量は低下していた。

一方 NIP1,2 の DKO 細胞においてはわずかなミトコンドリアの低下は認められたもの、cox2, cox4, tomm20 タンパク質の発現量は変化しなかった。

次に、ミトコンドリア機能を評価した。KD 細胞では酸素消費速度の OCR 値の低下が認められたのに対して (Fig. 5)、DKO 細胞では認められなかった (Fig. 6)。

更に OCR 値を用いて解析すると、NIP2 の KD 細胞において Basal level, 最大呼吸量, non-oxygen, spare respiratory cap, proton leak, ATP 産生量の低下が優位な差を持って観察された。

この結果から、特に NIP2 の KD によってミトコンドリアの品質管理機能が一時的に乱れることで、ミトコンドリアの数が減少し、その結果炎症性サイトカインの産生能が低下したものと考えられる。加えて NIP1 の KD 細胞において、炎症性サイトカイン IL8 の産生量が低下することから NIP1 が NIP2 の機能維持に関与していることが示唆された。

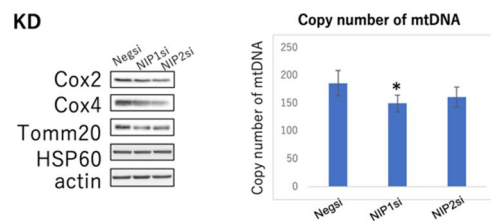


Fig. 4 NIP1 及び NIP2 の KD 細胞におけるミトコンドリア量の比較

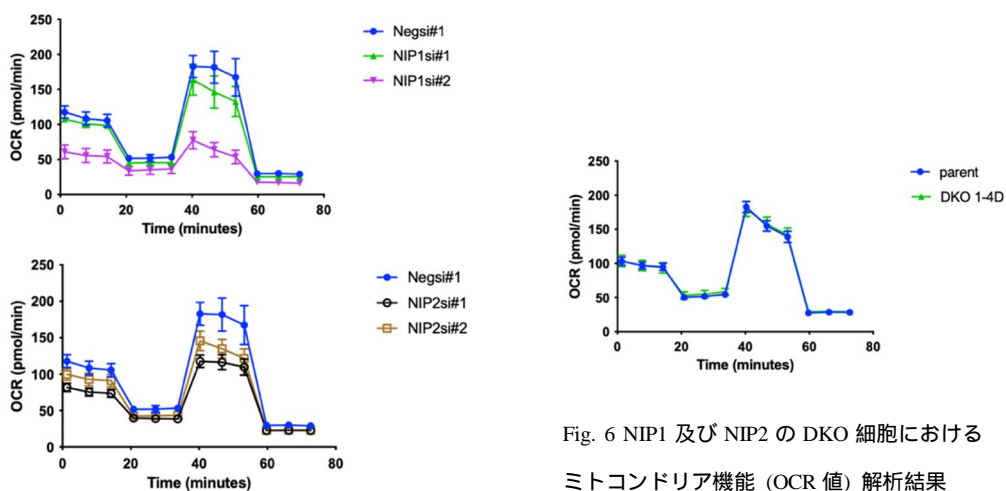


Fig. 5 NIP1 及び NIP2 の KD 細胞におけるミトコンドリア機能 (OCR 値) 解析結果

Fig. 6 NIP1 及び NIP2 の DKO 細胞におけるミトコンドリア機能 (OCR 値) 解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi-Tanimukai Y, Yamamoto S, Ogasawara N, Nakabayashi S, Mizuta K, Yamamoto K, Miyata R, Kakuki T, Jitsukawa S, Sato T, Tsutsumi H, Kojima T, Takano K, Yokota SI.	4. 巻 304
2. 論文標題 A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol Methods.	6. 最初と最後の頁 114528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2022.114528	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 Hiyama Y, Sato T, Takahashi S, Yamamoto S, Ogasawara N, Masumori N, Yokota SI.	4. 巻 102
2. 論文標題 Reduction of susceptibility to azoles and 5-fluorocytosine and growth acceleration in <i>Candida albicans</i> in glucosuria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagn Microbiol Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 115556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115556	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 Kim YJ, Kong Q, Yamamoto S, Kuramoto K, Huang M, Wang N, Hong JH, Xiao T, Levine B, Qiu X, Zhao Y, Miller RJ, Dong H, Meltzer HY, Xu M, He C.	4. 巻 19
2. 論文標題 An autophagy-related protein Becn2 regulates cocaine reward behaviors in the dopaminergic system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 eabc8310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc8310	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 該当する
1. 著者名 Murakami T, Takasawa A, Takasawa K, Akimoto T, Aoyama T, Magara K, Saito Y, Ota M, Kyuno D, Yamamoto S, Hasegawa T, Saito T, Osanai M.	4. 巻 112
2. 論文標題 Aberrant expression of junctional adhesion molecule-A contributes to the malignancy of cervical adenocarcinoma by interaction with poliovirus receptor/CD155	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 906-917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14734	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 Hiyama Y, Sato T, Takahashi S, Yamamoto S, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Yokota SI, Masumori N.	4. 巻 26
2. 論文標題 Sitafloxacin has a potent activity for eradication of extended spectrum β -lactamase-producing fluoroquinolone-resistant Escherichia coli forming intracellular bacterial communities in uroepithelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 1272-1277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.07.009	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	小笠原 徳子 (Ogasawara Noriko) (00438061)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	高澤 啓 (Takasawa Akira) (00593021)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------