

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893288

研究課題名(和文)ミトコンドリアの機能変化とインフラマソーム活性化のケミカルゲノミクス解析

研究課題名(英文)Chemical dissection of mitochondrial function and inflammasome activation

研究代表者

北見 俊守 (Kitami, Toshimori)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70708594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ミトコンドリア内の活性酸素が炎症反応(インフラマソーム活性化)に必要であり、多種の疾患を引き起こす原因であると考えられている。よって現在臨床などで使用されている化合物に自然免疫細胞(マクロファージ細胞)の活性酸素量を異変させる物があるか、またインフラマソーム活性化に影響があるか調べる事により、新しい毒性の発見や治療法の発見に繋がる事が期待される。本研究では過去に我々が行なったミトコンドリア化合物スクリーニングのデータを用い臨床で使用されている化合物の中から、マクロファージ細胞に強い炎症反応をもたらす化合物を発見した。この化合物を用いミトコンドリアと炎症反応の関係を現在追求している。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have highlighted the role of mitochondrial reactive oxygen species in innate immune response (in particular of NLRP3 inflammasome activation). Identifying clinically used drugs that have impact on mitochondrial reactive oxygen species in innate immune cells (such as macrophage) will be useful for understanding the role of mitochondria in inflammation as well as identifying new drug toxicity and therapeutic use. We took advantage of our previous mitochondrial chemical screening compendium and identified a unique compound that induced strong inflammatory response. We are currently pursuing the mechanism of action of this drug to understand the relationship between mitochondria and inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、薬理系薬学

キーワード：ミトコンドリア 化合物 代謝

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの変異は多種の疾患(2型糖尿病、パーキンソン病、心血管疾患)の原因に繋がっている。その疾患メカニズムに、インフラマソーム活性化が挙げられている。インフラマソームは自然免疫の一部で微生物や細胞ストレスから分泌される成分によって活性化され、IL-1Bを分泌し炎症をおこす。このインフラマソーム活性化にはミトコンドリア内の活性酸素が必要であると明らかにされた。また、ミトコンドリア機能を直接阻害する事で活性酸素量を上げインフラマソームを活性化させる事ができる。

2. 研究の目的

我々は臨床に使われている化合物の多くにミトコンドリア機能を阻害する物がある事をスクリーニングで発見した(Nature Biotechnology 26: 343-351)。本研究ではこのスクリーニングデータを用い、化合物が免疫細胞内でミトコンドリアにもたらす影響とインフラマソーム活性化の関係を明らかにし、新たな毒性や疾患防止に役立つ化合物を発見したい。

3. 研究の方法

(A) 過去に発表されたミトコンドリア阻害作用とインフラマソーム活性化の論文結果(Nature 469: 221)を再検討するため全種のミトコンドリア阻害剤とIL-1B分泌量について詳しく調べる。

(B) ミトコンドリア阻害作用によるIL-1B分泌が確認されたら、過去に我々が行なったミトコンドリア化合物スクリーニングからミトコンドリア機能を阻害した化合物を選び、マクロファージ細胞によるIL-1B分泌量を測定する。

(C) 化合物スクリーニングから強い影響のある化合物に対して、標的情報を基に詳しいメカニズムを追求する。

(D) 上記BとCの結果から、新たなスクリーニングの展開を計画する。

4. 研究成果

(A) ミトコンドリア阻害剤とIL-1B分泌量の関係

ミトコンドリアとインフラマソームの関係を再現するため、ミトコンドリア阻害剤4種を使い6時間投与後IL-1B分泌量を測定した

(図1) 過去の論文データと同様にミトコンドリア阻害剤によるIL-1B分泌量が確認された。影響が最も大きい化合物はATP合成を阻害する oligomycinであった。また脱共役剤 CCCP に関しては、化合物の濃度が5uM以上増えると、IL-1B分泌量が増えるのではなく、逆に減った。これ

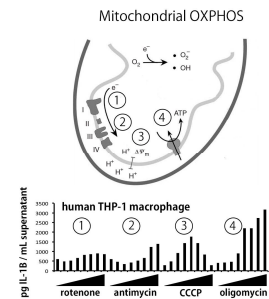


図1.ミトコンドリア阻害剤によるIL-1B分泌量への影響。

は、CCCPの毒性から考えられるものである。

(B) 新しく発見されたミトコンドリア阻害剤によるIL-1B分泌量への影響

次に過去の化合物スクリーニングデータから新しくミトコンドリア阻害作用が発見された約60種の中から、臨床で使用されている化合物23種を選び出した。これらがIL-1B分泌を引き起こすか、8用量(40uMから2倍で薄める)で6時間投与後測定した(図2)。複数の化合物は最大量の40uMでIL-1B分泌を引き起こした。その中で、化合物#14は他と比べ最少量の300nMでも大量のIL-1B分泌を引き起こした。これは、過去に発表されている化合物のなかで最も有効性にすぐれていることから、メカニズム追求によりミトコンドリアとインフラマソームの関係を深く追求する重要な化合物になると期待される。

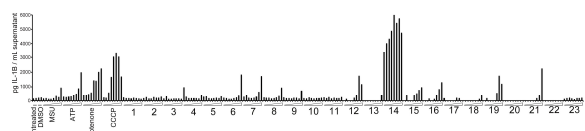


図2.ミトコンドリア阻害作用のある23種の化合物によるIL-1B分泌量への影響。左はポジティブコントロールである。

(C) 化合物#14による炎症反応への影響

23種の化合物スクリーニング(図2)で最も影響の大きかった#14化合物はミトコンドリア脱共役剤として知られている。ミトコンドリア生物学で代表的な脱共役剤 CCCP とIL-1B分泌量について比べてみると#14の方がCCCPより有効性と効力に優れていた(図3A)。分泌されたIL-1Bはウェスタンブロットにより正しく切断されている物だと確認できた(図3B)。また、細胞内のpro-IL-1B量をウェスタンブロットで測定すると(図3B)、#14はCCCPよりpro-IL-1B量を増やす事

ができると確認できた。よって IL-1B 遺伝子発現量を測定すると (図 3 .C) #14 の方が IL-1B mRNA の上昇を維持できる事が明らかになった。よって #14 は IL-1B 分泌と pro-IL-1B 生産両方に作用がある事が明らかになった。

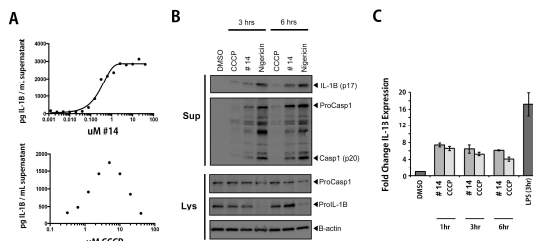


図 3 . (A) IL-1B 分泌量に対する化合物 #14 と脱共役剤の違い。 (B) 細胞内と分泌された IL-1B と Caspase-1 のウェスタンブロットによる測定。 (C) IL-1B mRNA の qPCR による測定。

(D) 新たな化合物スクリーニングへの展開

B で行った化合物スクリーニング (2 3 種) はミトコンドリア阻害作用のある物に絞っていたが、多種の化合物をスクリーニングすることによりインフラマソームとミトコンドリアの関係をより広い視点から解析できる。よって約 1 0 0 0 種の化合物を 40uM で 6 時間投与し、IL-1B 分泌量を測定した。結果、予想以上に数多くの化合物が IL-1B 分泌を引き起こした (図 4)

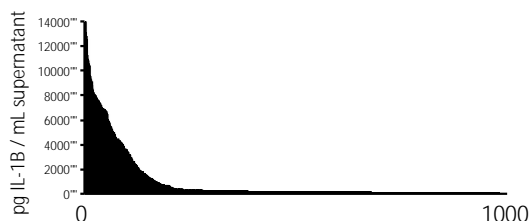


図 4 . IL-1B 分泌量を測定した化合物スクリーニング (対 1000 種)

化合物は用量が多いほど関わる標的の数も増えてくる。よって、IL-1B 分泌量に強い影響を与えた化合物に対して再度濃度を薄めてスクリーニングする事で、関わる標的の数を絞る事ができる。上位 1 0 0 種の化合物を 4 用量で再度スクリーニングしたところ (図 5) nM レベルでも影響のあった化合物は一握りにしかなかった。これらの中には上記 B で発見された化合物 #14 も含む。現在、化合物 #14 以外で nM レベルで IL-1B 分泌を引き起こした物を詳しく追求している。

方法としては、化合物の標的情報を基に、同じ標的を持つ他の化合物が同じ影響を与えるか、またその標的を遺伝子組み換えによりノックアウトなどした細胞を用い、標的を特定する。これにより、新しいインフラマソーム活性化のパスウェイ、またそれらがどのようにミトコンドリアに関わっているか検証できる。

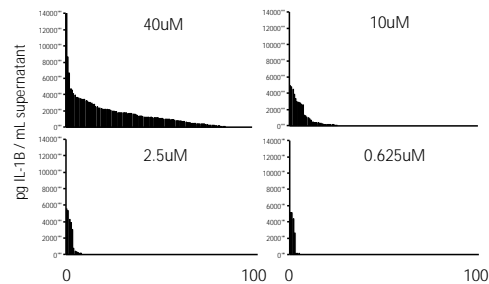


図 5 . 図 4 の化合物上位 1 0 0 を 4 用量で再度スクリーニングした結果。

次に、化合物 #14 による IL-1B 分泌を防ぐ化合物を発見するため、図 4 で使った化合物 1000 種 (40uM) を先に 1 時間投与し、その後化合物 #14 を投与し、IL-1B 分泌量を計った (図 6)。複数の化合物が IL-1B 分泌量を減らす事が出来た。これらが、より薄い濃度で同じ影響を与えられるか、4 用量で検証した (図 7)

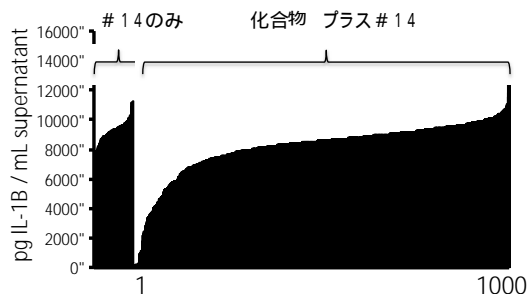


図 6 . 化合物 1 0 0 0 種を先に投与し、化合物 #14 による IL-1B 分泌を防ぐスクリーニング

図 6 にある上位 1 0 0 の化合物を 4 用量で再度スクリーニングすると、nM レベルで約 1 0 の化合物が IL-1B 分泌を防げる事が出来た (図 7)。これらは、抗炎症薬をいくつか含む。また、今までに標的や抗炎症作用が確認されていない物も複数含まれている。これらが、ミトコンドリアに影響を与え、IL-1B 分泌を防いでいるのか確認する必要がある。また、抗炎症薬は IL-1B の遺伝子発現を抑える作用もあるので、化合物による IL-1B 発現量も確認する必要がある。

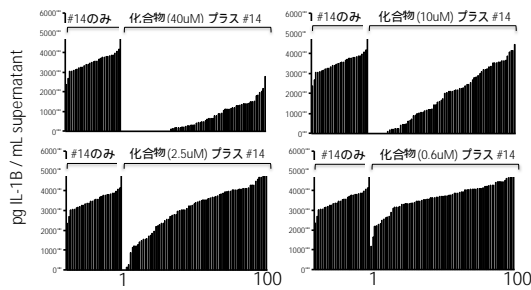


図7. 図6のスクリーニングから IL-1B 分泌量を下げられる化合物上位100位を再度スクリーニング。

(E) 今後の展開

(ア) 化合物#14 による IL-1B 分泌への影響

現在はなぜ化合物#14がCCCPより優れた有効性と効力があるのか、#14の他の標的を論文検索により見つけ出し実験で検証している。

化合物#14のメカニズム解明により、ミトコンドリア阻害作用と協力して強い炎症反応をもたらす新たなパスウェイの発見が期待される。また、この化合物のin vivoでの影響も今後視野に入れて検討していきたい。

また、化合物#14の炎症反応を積極的に抑える化合物の発見を今後スクリーニングで見つける事を目指す。ミトコンドリア阻害剤による炎症反応を抑えるので、インフラマソーム以外にもミトコンドリアが関わる疾患にも役立つ可能性がある。

(イ) IL-1B 分泌を活性化する新しい化合物

図4と5のスクリーニングから発見された、新しいIL-1B分泌作用のある化合物は、ミトコンドリアへの影響はまだ確認されていない。よって、これら化合物がミトコンドリア内の活性酸素量に影響を与えるか測定する必要がある。また化合物#14と同様にIL-1B mRNA量にも影響がないか調べる必要がある。

また、論文検索により標的を見つける事に重点を置く。標的情報が少ない化合物については遺伝子スクリーニングなどにより、標的パスウェイを発見する。これにより、インフラマソーム活性化作用のある新しい化合物とそのメカニズムが明確になる。

(ウ) IL-1B 分泌を防ぐ新しい化合物

IL-1B分泌を防ぐ化合物については、まず化合物の毒性により分泌量を減らしたか検討

する必要がある。また、これら化合物によるIL-1B発現量への影響とミトコンドリアへの影響を測定する必要がある。順位としてはミトコンドリアの活性酸素量を減らしIL-1B分泌量を減らす化合物に重点を置く。

標的の知られてない化合物については、(イ)と同様に遺伝子スクリーニングで標的パスウェイを発見する。

(F) まとめ

研究スタート支援による研究費により、IL-1B分泌を活性化させる新たな化合物を発見し、またそれを防ぐ化合物を複数発見した。これらは、現在報告されていない物が多く、また報告されている物よりも有効性に優れている事から、新たな研究の展開が期待される。

インフラマソーム活性化は多くの疾患に関わり、またミトコンドリア機能も多くの疾患に関わる事から、これら化合物のメカニズムをこれから深く追求することで複数の疾患の治療に役立つと期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.ims.riken.jp/labo/47/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北見 俊守 (Toshimori Kitami)
理化学研究所・統合生命医科学研究
センター・上級研究員
研究者番号：70708594