

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10994

研究課題名(和文) IL-15と類似した低分子化合物の探索と高齢者敗血症治療への応用

研究課題名(英文) In silico screening of Interleukin-15 mimetics and application for a treatment of elderly septic patients

研究代表者

井上 茂亮 (INOUE, Shigeaki)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30582209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン-15 (IL-15)はNK細胞やT細胞に作用し、細胞増殖や活性化を誘導するサイトカインである。in silicoスクリーニングによって選抜された候補化合物15種類においてSTAT5リン酸化を指標にアゴニスト(惹起)効果ならびにアンタゴニスト(抑制)効果を測定したところ、化合物N43で強い阻害作用(阻害率 32%)を認めた。さらにN6, N15, N35で弱い阻害作用を認めた。今後はサンドイッチELISA法を活用したIL-15ミメティクスのスクリーニング系の構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine that acts on NK cells and T cells and induces cell proliferation and activation. Evaluation of the effect on STAT5 phosphorylation of 15 compounds selected by in silico screening showed strong antagonistic (inhibitory) effect (inhibition rate 32%) with compound N43. In addition, weak inhibitory effect was observed for compounds N6, N15 and N35. In future, we aim to establish an evaluation system utilizing a sandwich ELISA method in the future.

研究分野：救急医学

キーワード：IL-15 In silico screening

1. 研究開始当初の背景

高齢者敗血症は予後不良である 敗血症は感染に伴う全身性炎症反応で、多臓器不全を伴い、その死亡率は極めて高い。米国では年間約 75 万人が敗血症に罹患し、年間死亡者数は約 20 万人で集中治療室における死亡原因の第 2 位である。そのうち 65 歳以上の高齢者は敗血症患者の約 60%であり、敗血症の死亡者数の約 80%を占める。申請者は 65 歳以上の高齢者敗血症の 3 ヶ月後生存率は 18-64 歳の成人敗血症と比較して有意に低く (59% vs. 90%; $p < 0.01$)、高齢者敗血症死亡例の約 80%が入院後 7 - 28 日後の亜急性期であることを報告した (Inoue, et al. Crit Care Med. 2013)。

高齢者由来 T 細胞は活性化されにくく、敗血症ではその数が減少する 敗血症では急性期のサイトカインストームと呼ばれる急性炎症反応の後、亜急性期には免疫抑制状態に陥り、易感染性を呈する。特に高齢者ではその傾向が顕著であり、申請者は高齢者の T 細胞は活性化されにくく、高齢者敗血症患者では約 3 週間にわたりリンパ球減少症が遷延することを発見した (Inoue, et al. Crit Care Med. 2013, Inoue, et al. Crit Care 2014)。以上より T 細胞の数と機能の低下が高齢者敗血症の亜急性期の免疫抑制状態の原因の一つと考えられ、今後はいかに高齢者由来 T 細胞を再活性化し、予後を改善できるかが高齢者における敗血症治療の課題となる。

IL-15 は高齢者由来 T 細胞を再活性化し、敗血症マウスの予後を改善する 申請者は高齢敗血症患者の有力な治療薬の候補として遺伝子組み換え蛋白インターロイキン-15 (IL-15) に注目している。IL-15 は NK 細胞や CD8+T 細胞の増殖に不可欠なサイトカインであり、これらの細胞の細胞死 (アポトーシス) を抑制する効果を示すことから、悪性腫瘍の治療効果を期待した腫瘍免疫を中心に研究がなされてきた。しかしながら生理活性

物質である IL-15 は、半減期が短く、大量生産が困難であるため、新規敗血症治療への応用は困難であると考えている。

2. 研究の目的

IL-15 受容体に結合し、同様生物活性を有する低分子化合物 (ミメティクス) を *in silico* で選抜し治療薬として開発することを目指す。また、IL-15 ミメティクスを特異的かつハイスループットに選別可能な評価系を構築する。

3. 研究成果

(1) *in silico* スクリーニング化合物の IL-15 アゴニスト・アンタゴニスト評価

in silico スクリーニングによって選抜された候補化合物は、NK 細胞由来細胞株 KAI-3 細胞において、ウエスタンブロットとフローサイトメーター (FACS) によって STAT5 活性化作用を測定した。一方、これらの計 15 化合物にアンタゴニスト活性があるかどうか、IL-15 刺激時に共存させた場合にリン酸化 STAT5 の出現を抑制できるかどうか評価した。アンタゴニスト活性が見られた場合、その化合物は IL-15 レセプターへ結合している可能性を示唆する。得られた情報は *in silico* の更なるスクリーニングのための重要な情報となることが期待される。

(2) IL-15 レポーターアッセイ系の構築

樹立した Jurkat 細胞にウイルスベクター等で IL-15 レセプターサブユニット遺伝子 (鎖、鎖) を安定発現させ、IL-15 応答性を回復させることを試みた。また同時に、ゲノム遺伝子に容易に挿入される IL-15 レポーターコンストラクトを新たに作成して、IL-15 応答細胞の樹立を試みた。この評価系で得られる結果は、*in silico* での 2 次スクリーニングにフィードバックし、さらに活性を高めるための分子設計に利用する。このように *in*

silico 改変と *in vitro* 評価を繰り返し、リード化合物を選抜する。

4. 研究成果

(1) *in silico* スクリーニング化合物の IL-15 アゴニスト・アンタゴニスト評価

in silico スクリーニングによって選抜された候補化合物 50 のうち、購入可能な化合物は 15 種類であった。これらの 15 の化合物で IL-15 受容体に対して、STAT5 リン酸化を指標に化合物スクリーニングをおこなったが、アゴニスト効果を有する化合物は認められなかった。しかしながらアンタゴニストとして、化合物 N43 で強い阻害作用 (阻害率 32%) を認めた (図 1, 2)。さらに化合物 N6, N15, N35 で弱い阻害作用を認めた。今後は、再現性の確認ならびに、阻害効果のあった N43 を中心に、培養時間・濃度など至適条件を検討するとともに、HTS 評価系 (*in vitro* IL-15 活性評価系) も構築していく予定である。さらに自己免疫疾患のマウスモデルで *in vivo* 評価も検討している。

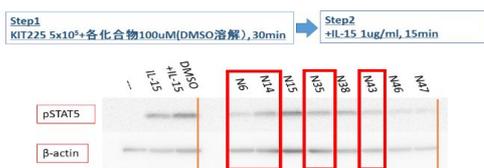


図1 ウェスタンブロットによる *in silico* screening 化合物の IL-15 アンタゴニスト評価
化合物 N43 で強い阻害傾向と、N6, N15, N35, N47

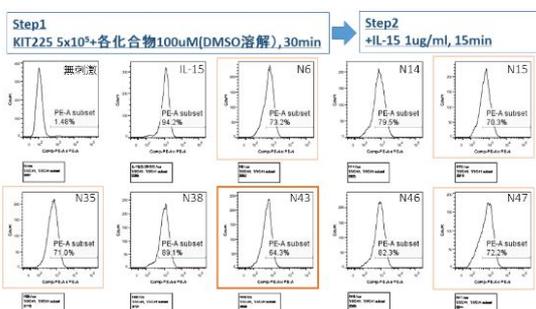


図2 フローサイトメトリーによる *in silico* screening 化合物の IL-15 アンタゴニスト評価
化合物 N43 で強い阻害傾向と、N6, N15, N35, N47 に軽度の阻害効果を認めた。

(2) IL-15 レポーターアッセイ系の構築

IL-15 応答能のある細胞株に、IL-15 応答レ

ポーター遺伝子を導入して安定発現株を樹立し、多数の化合物を同時に評価できる 96 ウエルプレートを用いたハイスループット評価系の確立を試みた。IL-15 レセプターが活性化されると JAK キナーゼの活性化を介して、転写因子 STAT-5 がリン酸化され、転写因子として活性型となる。そこで STAT5 レポーターコンストラクト (STAT5-ルシフェラーゼ-ハイグロマイシン耐性遺伝子、プロメガ社) を IL-15 応答能を有する細胞株 (生存・増殖に IL-2 が必須) である KAI-3 細胞と IL-TMAT 細胞、ならびに対照として白血病細胞である Jurkat 細胞と K562 細胞に、エレクトロポレーションによって導入し、ハイグロマイシン耐性細胞 (遺伝子安定導入細胞) の選択を行った。この結果、完全な不死化細胞である Jurkat 細胞と K562 細胞のみ、STAT5-レポーター遺伝子の安定発現細胞が得られた。しかし、Jurkat 細胞と K562 細胞とも非刺激状態 (血清除去) においても、高いルシフェラーゼ活性を示し、IL-15 または IL-2 を添加しても活性の上昇は見られなかった。

(3) K562 細胞への IL-2 レセプターの鎖遺伝子の導入

Jurkat 細胞は IL-2 レセプターが欠損しているという報告がある。そこで、Jurkat 細胞ならびに K562 細胞の IL-2 レセプターの発現ならびに変異の有無を調べた。その結果、K562 細胞においては IL-2 レセプターの鎖の発現が欠如していることが判明した。一方、Jurkat 細胞については、鎖遺伝子は発現しているが点変異があり、この結果 Thr220 が Met に置換されることが判明した。そこで、IL-15 を応答性のある KAI-3 細胞から変異のない鎖の cDNA をクローニングし、レンチウイルスベクターを用いての導入を試みた。K562 細胞においては、遺伝子導入後、鎖の安定発現細胞をフローサイトメーターにて分離し、安定発現細胞の樹立に成功した。一

方、Jurkat 細胞は我々が用いた最大のウイルス濃度においても遺伝子導入はできなかった。

(4) イマチニブ処理の効果

鎖導入 K562 細胞の IL-2 ならびに IL-15 応答性を測定した。しかしながら、この細胞は未処置の状態でも依然として高いルシフェラーゼ活性を示し、IL-15 の添加によって活性の上昇は見られなかった。

慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞である K562 細胞は、チロシンキナーゼ c-Abl が Bcr と融合し、恒常的に活性型の Bcr-Abl となっている。STAT-5 は Bcr-Abl の基質の一つとして報告されているため、非刺激時でも見られる高いルシフェラーゼ活性が Bcr-Abl 活性に起因している可能性が考えられた。そこで、Bcr-Abl の阻害剤であるイマチニブを添加してルシフェラーゼ活性低下するか検討した。その結果、イマチニブ添加後 12 時間以降においてルシフェラーゼ活性が低下することが判明した。そこで、12 時間のイマチニブ処理により Bcr-Abl を阻害した後で IL-15 で刺激を行い、ルシフェラーゼ活性が上昇するか調べた。しかし、この状態の細胞も IL-15 刺激によるルシフェラーゼ活性上昇は見られなかった。IL-15 アンタゴニスト評価においては、再現性の確認ならびに、阻害効果のあった化合物 N43 を中心に、培養時間・濃度など至適条件を検討するとともに、HTS 評価系 (in vitro IL-15 活性評価系) を構築していく予定である。さらに自己免疫疾患のマウスモデルで in vivo 評価も検討している。

また STAT5 応答レポーター遺伝子の発現を指標として IL-15 ミメティクスの HTS 系の構築を試みた。しかし、IL-15 応答細胞では、レポーター遺伝子の導入した安定発現細胞の樹立が困難であった。今後はサンドイッチ ELISA 法を活用した評価系の確立を目指す。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Yatabe T, Inoue S, Sakaguchi M, Egi M: The optimal target for acute glycemic control in critically ill patients: a network meta-analysis. *Intensive Care Med* 2017, 43:16-28. (査読あり)
2. Watanabe N, Suzuki Y, Yonezu T, Nakagawa Y, Shiina T, Hirayama N, Inokuchi S, Inoue S: A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule. *Sci Rep* 2017, 7:6798. (査読あり)
3. Sawamoto T, Aoki H, Otsuka H, Morita S, Inoue S, Nakagawa Y, Inokuchi S: Successful Treatment of Blunt Musculophrenic Artery Injury by Transcatheter Arterial Embolization: A Case Report. *Tokai J Exp Clin Med* 2017, 42:126-129. (査読あり)
4. Sato F, Nakagawa K, Kawauchi A, Matsubara A, Okegawa T, Habuchi T, Yoshimura K, Hoshi A, Kinoshita H, Miyajima A, et al.: Laparoendoscopic single-site surgeries: A multicenter experience of 469 cases in Japan. *Int J Urol* 2017, 24:69-74. (査読あり)
5. Okazaki T, Hifumi T, Kawakita K, Shishido H, Ogawa D, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Inoue S, Tamiya T, et al.: Serial blood lactate measurements and its prognostic significance in intensive care unit management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *J Crit Care* 2017, 41:229-233. (査読あり)
6. Morandi A, Piva S, Ely EW, Myatra SN, Salluh JIF, Amare D, Azoulay E, Bellelli G, Csomos A, Fan E, et al.: Worldwide Survey of the "Assessing Pain, Both

Spontaneous Awakening and Breathing Trials, Choice of Drugs, Delirium Monitoring/Management, Early Exercise/Mobility, and Family Empowerment" (ABCDEF) Bundle. *Crit Care Med* 2017, 45:e1111-e1122. (査読あり)

7. Kotaki R, Higuchi H, Ogiya D, Katahira Y, Kurosaki N, Yukihiro N, Ogata J, Yamamoto H, Mohamad Alba S, Azhim A, et al.: Imbalanced expression of polycistronic miRNA in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2017, 106:811-819. (査読あり)
8. Kondo Y, Fuke R, Hifumi T, Hatakeyama J, Takei T, Yamakawa K, Inoue S, Nishida O: Early rehabilitation for the prevention of postintensive care syndrome in critically ill patients: a study protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2017, 7:e013828. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 井上 茂亮. 高齢者手術における感染症対策「免疫老化」から考える高齢者敗血症とその対策 第29回日本外科感染症学会学術集会 2016年11月
2. 井上 茂亮. Shock病態における炎症・細胞死とダイニング・コードの関与 免疫老化とリンパ球アポトーシス 侵襲時におけるその意義と治療への展望 第31回日本Shock学会総会 2016年10月
3. 井上 茂亮. 加齢とT細胞 exhausted T細胞を中心に 第31回日本Shock学会総会 2016年10月
4. 井上 茂亮. 救急医学研究を発展させるために 現場の素朴なギモンからはじめる救急トランスレーショナルリサーチ 第45回日本救急医学会総会・学術集会 2016年10月
5. 井上 茂亮. 加齢による獲得免疫機能障害 免疫老化のメカニズムと新規敗血症

治療戦略 第53回日本外科代謝栄養学会学術集会 2016年7月

6. 井上 茂亮. 市民への情報発信としてのホームページ 第43回日本集中治療医学会学術集会 2016年2月
7. 井上 茂亮. 敗血症関連脳症 高齢者における敗血症性脳症の病態とその対策 第43回日本集中治療医学会学術集会 2016年2月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 茂亮 (INOUE, Shigeaki)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 30582209

(2)研究分担者

平山 令明 (HIRAYAMA, NORIAKI)

東海大学・先進生命科学研究所・教授

研究者番号: 70238393