

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17947

研究課題名(和文) ミクログリアに起因する慢性炎症を制御する新規治療薬の探索研究

研究課題名(英文) Drug discovery and research for regulation of chronic inflammation caused by microglial activation

研究代表者

山下 智大 (YAMASHITA, Tomohiro)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：30645635

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)：ミクログリアからの過剰な炎症性因子の放出が、慢性炎症を伴う中枢神経系疾患の発症や維持に関与する。そこで本研究ではスクリーニングにより、既存薬の中からミクログリアにより生じる慢性炎症を制御する化合物の探索を目指した。本成果よりP2X7受容体の機能を阻害する化合物を発見し、これら化合物はミクログリアからのIL-1 β の放出も抑えた。さらに最も有力な化合物は神経障害性疼痛を抑えることに成功した。加えてIL-1 β の産生や放出を抑える化合物が慢性炎症に基づくうつ様行動を抑えることにも成功した。これらの結果からスクリーニングにより発見した既存薬がミクログリアにより生じる慢性炎症を制御できる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の医薬品開発において、創薬ターゲットの枯渇が問題視されている中、安全性に関する適正な情報を有する既存薬の中から中枢のミクログリアに新たな薬効を示す化合物を見出すことを目的とした本研究は、画期的な治療戦略法となり得る。本研究結果からミクログリアを標的とした革新的な中枢疾患系疾患の治療薬につながる事が期待でき、学術的意義および社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The excess production and release of inflammatory factors from microglial cells are involved in the development and maintenance of central nervous system inflammation. Therefore, in this study, we aimed to search for compounds to regulate microglia-mediated inflammation among approved drugs libraries by high-throughput screening (HTS). We found that some compounds inhibit not only the function of P2X7R but also the release of IL-1 β from microglial cells. Moreover, we succeeded that intrathecal administration of a potent compound among them produced a reversal of nerve injury-induced mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. In addition, we also succeeded that a compound, which suppresses the production and release of IL-1 β from microglial cells, recovered depressive-like behavior caused by chronic inflammation. These results suggest that approved drugs discovered by HTS may be able to regulate microglia-mediated inflammation.

研究分野：創薬薬理

キーワード：ミクログリア 医薬品探索 サイトカイン ATP受容体 慢性炎症 P2X7受容体 IL-1 アカデミア創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミクログリア細胞は中枢神経系を構成するグリア細胞の一つで、中枢の免疫担当細胞として知られている。ミクログリアは組織の異常を感知し、ひとたび活性化型へと移行すると液性因子(炎症性因子や細胞障害性因子)の産生放出を誘発し、炎症が起因とする中枢神経系疾患(神経障害性疼痛や慢性ストレス)の発症に深く関与する。それ故、中枢の慢性炎症を抑える手段として、活性化したミクログリアによる炎症応答の沈静化が注目されているが、これまでにミクログリアを標的とした治療薬は上市されていないのが現状である。さらに新薬開発には膨大な経費と長い年月が必要となるという厄介な問題も控えている。

2. 研究の目的

本研究では、ハイスループットスクリーニング技術を駆使することで、すでに安全性や作用機序が明らかになっている既存薬ライブラリーおよび安全性が高い薬用天然物の中から「ミクログリアにおいて炎症惹起に関わる ATP 受容体 (P2X7 受容体) の機能を阻害する化合物の探索」および「ミクログリアから放出する炎症性サイトカイン(インターロイキン-1 β (IL-1 β)) を制御する化合物または抗炎症性サイトカイン(インターロイキン-10 (IL-10)) の産生を促進する化合物の探索」という2つのアプローチ方法から、革新的な慢性炎症の制御治療薬の発見、さらには病態動物モデルにおける有効性を確認する。

3. 研究の方法

(1) ハイスループットスクリーニング法による Ca²⁺イメージング法

1321N1 細胞にラット P2X7 受容体を安定発現させた細胞 (rP2X7R-1321N1) を 96 ウェルプレートに播種し、一晚培養後に Ca²⁺蛍光指示薬 Fluo 4-AM を細胞に取り込ませた。ローディング後、アッセイ用の細胞外溶液 (BSS) に置換し、FDSS7000EX を用いて測定を行った。化合物を前処置してから Bz-ATP (P2X7 受容体刺激薬) で刺激した際の経時的な蛍光強度の変化を計測した。また東京大学創薬機構から提供された既承認薬 1,914 化合物を評価した。

(2) 単一細胞における Ca²⁺イメージング法

rP2X7R-1321N1 もしくはラット初代培養ミクログリア細胞を培養チャンバー flexiperm に播種し、一晚培養後に Ca²⁺蛍光指示薬 Fura2-AM を細胞に取り込ませた。ローディング後、BSS に置換し、倒立蛍光顕微鏡を用いて化合物処置後の Bz-ATP 刺激によるカルシウム応答を計測した。得られたデータは Aquacosmos を使用して解析を行った。

(3) YO-PRO-1 アッセイ法

rP2X7R-1321N1 あるいはヒト P2X7 受容体 (hP2X7R) -1321N1 を 96 ウェルプレートに播種、培養後に核酸蛍光染色試薬 YO-PRO-1 溶液に溶解した化合物を前処置した。その後 Bz-ATP で刺激し、YO-PRO-1 の蛍光強度をプレートリーダー EnSpire で計測した。

(4) NanoLuc レポーターアッセイ法による IL-1 β および IL-10 の活性評価

スクリーニングシステムとして、NanoLuc ルシフェラーゼおよび IL-1 β の活性を反映させた検出系 (IL-1 β プロモーター活性と caspase 活性による制御) もしくは IL-10 の活性を反映させた検出系 (IL-10 プロモーター活性による制御) のプラスミドを構築して、ミクログリア細胞株である BV-2 に発現させた。そして各細胞を 384 ウェルプレートに播種し、市販の既存薬 1,599 化合物の処置に加えリポ多糖 (LPS) や ATP などの各種刺激後に、ルシフェラーゼによる発光強度をマルチモードプレートリーダー EnSpire で計測した。

(5) IL-1 β mRNA およびタンパク質の定量

IL-1 β mRNA の検出は マウスミクログリア細胞株である BV-2 細胞もしくは C8-B4 細胞を用いて検討を行った。24 ウェルプレートに細胞を播種し、培養後に化合物と LPS および ATP を共処置した細胞より RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR 法により IL-1 β mRNA 発現量を測定した。また IL-1 β タンパク質の放出は、BV-2 細胞やラット初代培養ミクログリア細胞、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、培養後に化合物を前処置し、続いて LPS および ATP もしくは Bz-ATP を加えて刺激した。その後、培養上清中の IL-1 β タンパク質を ELISA 法で定量した。

(6) 神経障害性疼痛モデルラットに対する薬物の評価

神経障害性疼痛病態モデルラットは第 5 腰髄神経を結紮し、その末梢側を切断することによって作成した。痛み行動測定法 (von Frey test) はフィラメントを用いてラット足底部に軽度機械刺激を加えた際の疼痛関連行動の有無を観察し、その刺激に対する 50% 後肢逃避閾値を算出した。また神経損傷後 7 日目より薬物を髄腔内に連日投与し、投与後 30 分毎に痛み行動の測定を行った。

(7) うつ様行動に対する薬物の評価

LPS 誘発性炎症モデルマウスは C57BL/6J 雄性マウスにおいて、LPS を腹腔内投与することに

よって作成した。15 分間のトレーニング時間の後 1 時間経過してから、5 分間の強制水泳試験をビデオ撮影し、無動時間を計測した。薬物は LPS 腹腔内投与の 30 分前に腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) P2X7 受容体の機能を阻害する既承認薬の探索

既承認薬から構成される化合物ライブラリー (1,979 化合物) の中から、カルシウムイメージング法によりラット P2X7 受容体の機能を阻害する化合物の探索を試みた。その結果、ラット P2X7 受容体の機能を強く阻害し、経口投与が可能な 3 種類の既承認薬 (尿酸排泄促進薬のベンズプロマロン、喘息治療薬のザフィルルカストそして高血圧治療薬のシルニジピン) に着目した。これら既承認薬はラットおよびヒト P2X7 受容体を介したカルシウム流入および小孔形成 (YO-PRO-1 アッセイ) に対して濃度依存的な阻害作用を確認した。

(2) ミクログリア細胞に対する P2X7 受容体の薬効評価

ラット初代培養ミクログリア細胞に対して高濃度 ATP 刺激および Bz-ATP 刺激 (P2X7 受容体アゴニスト) により誘発するカルシウム流入は P2X7 受容体の機能を阻害する 3 種類の既承認薬を前処置することで有意に抑制した (図 1)。さらに LPS および ATP により刺激したラット初代培養ミクログリア細胞から放出される炎症性サイトカインである IL-1 β に対して、3 種類の既承認薬はいずれも IL-1 β の放出を顕著に抑制することを明らかにした。中でも最も強力に抑制作用を発揮したシルニジピンは、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞への LPS および Bz-ATP 刺激による IL-1 β の放出も有意に抑制することを確認した。

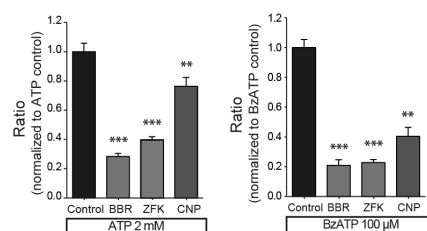


図 1. ベンズプロマロン (BBR)、ザフィルルカスト (ZFK)、シルニジピン (CNP) はラット初代培養ミクログリア細胞に対する ATP および Bz-ATP 誘発カルシウム応答を抑制する

(3) 神経障害性疼痛モデルラットへの薬効評価

神経障害性疼痛は、脊髄ミクログリアから放出される炎症性サイトカインが影響を及ぼす。そこで IL-1 β の放出を顕著に抑制するシルニジピンの効果を検証した。シルニジピンを神経障害性疼痛病態モデルラット (神経損傷後 7 日目もしくは 14 日目) の髄腔内に投与したところ、疼痛閾値の回復が認められた。

(4) ミクログリアから産生放出される炎症性サイトカインを制御する化合物探索

ミクログリアから産生放出される炎症性サイトカインを制御する化合物探索を目的として、NanoLuc ルシフェラーゼを利用した IL-1 β シグナル検出系および IL-10 シグナル検出系を開発した。本システムを利用して、天然物ライブラリー (319 化合物) および生理活性物質ライブラリー (1,280 化合物) の計 1,599 化合物を評価した結果、ミクログリアから IL-1 β の放出を抑えることが未報告の 2 種類の化合物 (高血圧治療薬および植物フラボノイドである化合物 X) に着目した。このうち化合物 X は NanoLuc レポーターアッセイ法によるスクリーニングの結果と一致して、ミクログリア細胞株である BV-2 細胞からの IL-1 β タンパク質の放出を有意に抑制し、さらに IL-1 β mRNA の発現も有意に抑制することを明らかにした。加えて、生理活性物質のノルアドレナリンが炎症性サイトカインである IL-1 β のプロモーター活性を惹起することを見出した (Tozaki-Saitoh H, et. al., J. Pharmacol. Sci., 2020)。

(5) LPS 誘発性炎症モデルマウスへの薬効評価

マウスに LPS を投与することで、ミクログリアが起因となる炎症応答に基づき、うつ様行動が惹起されることが報告されている。そこで化合物 X の抗炎症効果を評価するために、LPS 誘発性炎症モデルマウスを用いて強制水泳試験を行った。マウスに LPS を腹腔内投与することで、強制水泳試験による無動時間が有意に延長した。一方で、化合物 X を前投与することで LPS の腹腔内投与による無動時間の延長を有意に減弱させた (論文作成中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

山下智大、エコファーマによる新規神経障害性疼痛治療薬の探索、査読有、ファルマシア、55 巻 3 号、2019、213-217
DOI: org/10.14894/faruawpsj.55.3_213

Yamamoto S, Yamashita T*, Ito M, Caaveiro JMM, Egashira N, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M. New pharmacological effect of fulvestrant to prevent oxaliplatin-induced neurodegeneration and mechanical allodynia in rats. International Journal of Cancer, 査読有, 145, 2019, 2107-2113
DOI: 10.1002/ijc.32043.

Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. [Green Pharma: A New Strategy for

Drug Discovery in Academia by Targeting Glial Cells and ATP Receptors]. Yakugaku Zasshi, 査読有, 138, 2018, 1027-1031
DOI: 10.1248/yakushi.17-00211-1

Tozaki-Saitoh H, Sasaki I, Yamashita T*, Hosoi M, Kato T.A, Tsuda M. Involvement of exchange protein directly activated by cAMP and tumor progression locus 2 in IL-1 β production in microglial cells following activation of β -adrenergic receptors. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 2020, 143, 133-140
DOI: 10.1016/j.jphs.2020.03.004

〔学会発表〕(計5件)

山下智大, Drug discovery technologies to achieve pain relief through drug repositioning approaches (ドラッグリポジショニングによる疼痛緩和を達成するための創薬技術), 口頭(学会招聘), 第92回日本薬理学会年会, 2019.3.14-16, 国内(大阪)

Yamashita T, Kamikaseda S, Tanaka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, New pharmacological effects of approved drugs targeting P2X7 receptors against the release of IL-1 from microglial cells and neuropathic pain after peripheral nerve injury, ポスター, WCP2018, 2018.7.1-6, 国際(Kyoto, Japan)

Yamashita T, Microglial ATP receptors in neuropathic pain, 口頭(国際学会招聘), Purines 2018, 2018.6.19-22, 国際(Foz do Iguacu, Brazil)

Yamashita T, Kamikaseda S, Tanaka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, New pharmacological effects of approved drugs targeting P2X7 receptors against the release of IL-1 from microglial cells and neuropathic pain after peripheral nerve injury, ポスター, Purines 2018, 2018.6.19-22, 国際(Foz do Iguacu, Brazil)

笹木泉, 山下智大, 齊藤秀俊, 津田誠, アドレナリン受容体を介したミクログリアの炎症応答調節, 第35回日本薬学会九州支部大会, 2018.11.17-18, 国内(福岡)

〔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

<http://global.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 津田 誠

ローマ字氏名:(TSUDA, Makoto)

研究協力者氏名: 齊藤 秀俊

ローマ字氏名:(SAITOH, Hidetoshi)

研究協力者氏名: Caaveiro Jose

ローマ字氏名:(カアベイロ, ホセ)

研究協力者氏名: 井上 和秀

ローマ字氏名:(INOUE, Kazuhide)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施

や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。