

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15415

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーで拓く統合的ストレス応答を標的とするTh17分化制御薬開発

研究課題名(英文) Developing Th17 differentiation regulators that target integrated stress response using chemical biology approaches

研究代表者

濱田 良真 (HAMADA, Yoshimasa)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：90805772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：統合的ストレス応答(ISR)キナーゼを介したTh17分化阻害により、IL-17病原性疾患の治療薬の基盤を作ることを目指している。ISRレポーター細胞を用いたHTSより、ISRを活性化するNigericin (Nig)を同定した。Nigはミトコンドリア膜電位を変化させOMA1-DELE1-HRIシグナルを活性化していることを明らかにした。マウスの脾臓やヒトの血液からCD4+ T細胞を抽出し、Th17へ分化させた。対照群はIL-17分泌が検出されたが、分化誘導時にNigを共投与した群ではIL-17の分泌が抑制された。EAE病態および乾癬誘導実験においても、Nigにより病態が改善された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

北里大学の化合物ライブラリーをISR応答性レポーター細胞でスクリーニングし、低濃度で強力にISRを活性化できるNigを同定した。ヒト由来、マウス由来細胞のタンパク質レベルでもISRを活性化できたことから、高精度なISRレポーター、及び北里大学の化合物ライブラリーの有用性の学術的意義は大きい。北里大学天然化合物ライブラリーはノーベル賞を受賞した大村智先生が構築しており、スクリーニング用に広く提供されている。広範な研究分野で実績を上げており社会的な注目度も高い。今回の研究成果はISRがTh17関連疾患の標的になることを強く示唆しており、Th17関連疾患の治療薬、悪化予防薬への期待ができる。

研究成果の概要(英文)：There is a need to develop a therapeutic agent for IL-17 pathogenic diseases by inhibiting Th17 differentiation via integrated stress response (ISR) kinase. From HTS using ISR reporter cells, we identified Nigericin (Nig), which activates the ISR, and found that Nig activates OMA1-DELE1-HRI signaling by altering mitochondrial membrane potential. CD4+ T cells were extracted from mouse spleen and human blood, and differentiated into Th17. In the control group, IL-17 secretion was detected, but in the group co-treated with Nig during differentiation induction, IL-17 secretion was suppressed; in EAE pathology and psoriasis induction experiments, Nig improved the pathology.

研究分野：小胞体ストレス応答

キーワード：小胞体ストレス応答 統合的ストレス応答 UPR ISR Th17細胞 IL-17 HTS

1. 研究開始当初の背景

細胞が様々なストレスに曝されると翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化 (P-eIF2) を介した統合的ストレス応答 (ISR) が誘導される (図 1)。ISR キナーゼには HRI、PKR、PERK、GCN2 があり、それぞれヘム欠乏、ウイルス感染、小胞体ストレス、アミノ酸飢餓によって活性化される。各ストレスへの初期応答は P-eIF2 による翻訳抑制で適応され、P-eIF2 による翻訳抑制を受けない ATF4 活性化によってストレス適応因子が転写誘導される。ISR

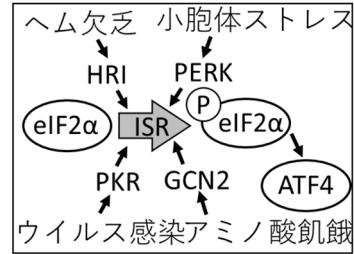


図1: ISRキナーゼとストレス

の破綻は細胞レベルでは細胞死を誘導し、個体レベルでは糖尿病や神経疾患等の病因であるため創薬ターゲットとして開発が進んでいる。近年、Th17 細胞産生性インターロイキン 17 (IL-17) や IL-23 が関節リウマチや実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病因であることが報告され (Nature, 2003; Nat Immunol., 2005; J Exp Med., 2007) (図 2)。Th17 分化抑制化合物ハロフジノン (HF) により EAE 病態スコアが改善することが報告されている。この Th17 の分化抑制化合物の探索において発見された HF は GCN2 活性化能により EAE を改善していることが示唆された (Science, 2009)。より強力な Th17 の分化抑制治療薬は ISR をターゲットとした化合物から同定できる可能性がある。しかし、その他の ISR キナーゼを介した Th17 分化制御は未解明であるため “GCN2 以外の ISR キナーゼを介した Th17 分化抑制” を研究の核とした。

- ・自己免疫疾患
- ・炎症性腸疾患
- ・多発性硬化症 (クローン病)
- ・関節リウマチ (潰瘍性大腸炎)
- ・EAEモデル
- ・乾癬

図2: Th17サイトカイン関連疾患

2. 研究の目的

ISR を介して Th17 分化を抑制する治療薬候補化合物を同定、及びその制御機構解明を目的とした (図 3)。



図3: Th17分化抑制剤の探索

3. 研究の方法

化合物同定は所属研究室において独自に構築した ISR、及び小胞体ストレス応答 (UPR) のレポーター細胞を用いてハイスループットスクリーニングで選定できる。また、ISR 活性化の際、どのキナーゼが寄与しているかタンパク質発現レベルで特定する細胞も複数ライン作製している。これらの細胞系を駆使して、絞り込み、同定、確認を行う。Th17 分化能への寄与はマウス脾臓から単離した CD4+T 細胞に既知のサイトカインを投与し、ELISPOT を用いて定量する。細胞レベルで Nig による IL-17 産生への寄与が確認できれば、個体レベルでの EAE モデル実験を行い、病態スコアを改善できるか検討する。

4. 研究成果

ISR 活性化レポーター細胞、及び UPR 活性化レポーター細胞を用いて、ISR を強力に活性化し、UPR 活性化レポーターは活性化誘導しない化合物 Nigericin (Nig) を

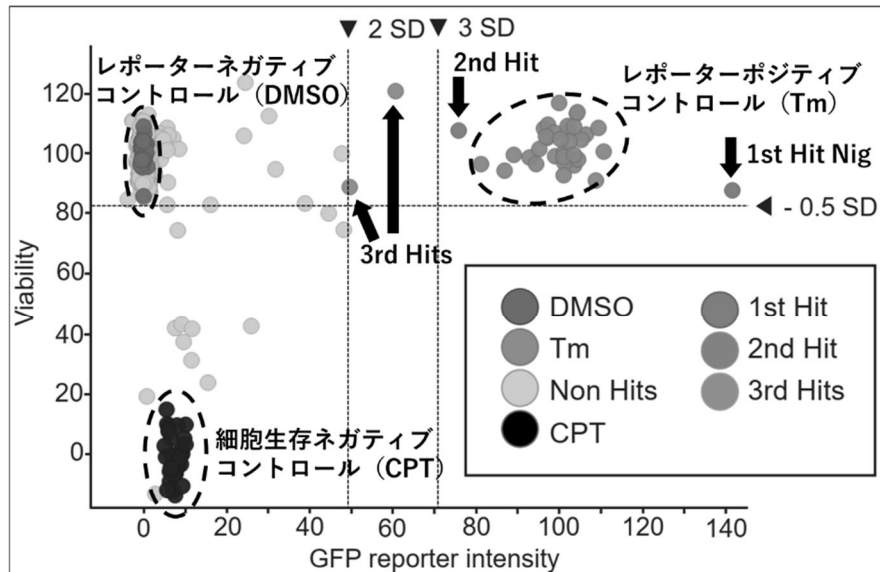


図4: ISRレポーター細胞によってNigを同定

同定した(図4)。スクリーニングした北里大学ライブラリー654化合物の中で唯一、NigだけがISRのみをポジティブコントロールより強力に活性化する化合物として同定された。

次に、タンパク質発現レベルで解析を行った。MEFの野生型細胞、4つのISRキナーゼをKOしたMEF細胞(4KO細胞)、4KO細胞に各キナーゼをレスキューした細胞(4KO+HRI, PKR, PERK or GCN2)を用いて解析した結果、NigによるISR活性化に寄与するISRキナーゼはHRIであることを同定した(図5)。これはヒト由来のHap1細胞において、各ISRキナーゼを単独でKOした細胞(HRI KO, PKR KO, PERK KO and GCN2 KO)を作製しタンパク質発現を解析したところ、同様の結果が再現された(図5)。これらの結果より、ISRキナーゼHRI介して強力にISRを活性化できる化合物Nigを同定した。

さらに、NigによるHRI活性化について詳細な解析を行い、Nigはミトコンドリア膜電位において過分極を誘導し、ミトコンドリアストレスシグナル、OMA1-DELE1-HRIシグナルを活性化していることを明らかにした(図6)。

Th17分化能への寄与を解析するため、マウス脾臓から単離したCD4+T細胞に既知のサイトカインを投与し、ELISPOTを用いて定量した。細胞レベルでNigはHF同様にIL-17産生(Th17分化)を抑制した(図7)。個体レベルの解析においてNigはEAEモデル実験の病態スコアの改善を示した(図8)。さらに、Th17分化実験(IL-17産生検出)をヒトの血液から単離したCD4+T細胞で行うと、NigによりIL-17産生を抑制することができた。これらの結果より、強力なISR誘導剤Nigが新規Th17病因性の治療薬ターゲットとなることが示された。

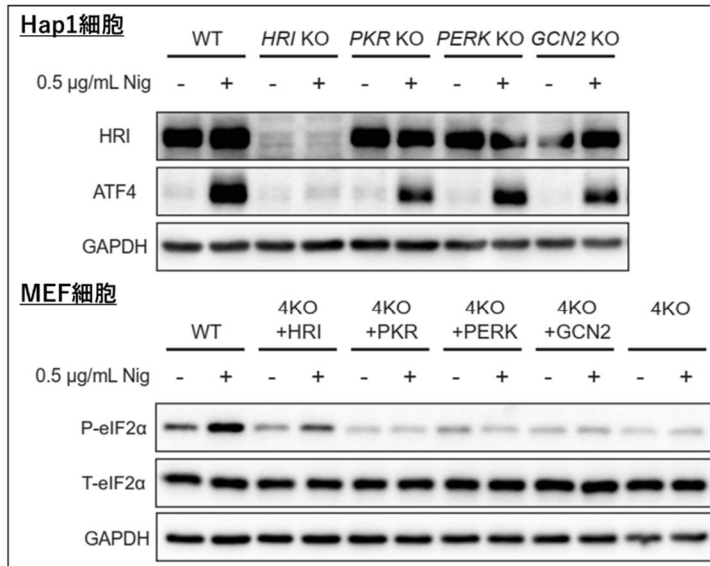


図5: NigはHRIを介してISRを制御する

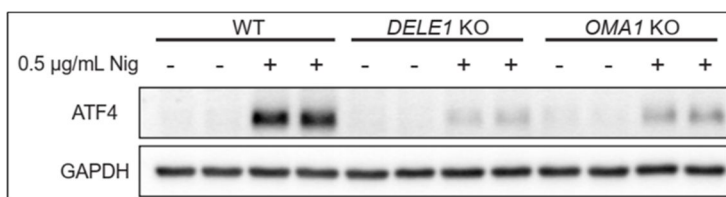


図6: NigはOMA1-DELE1-HRIシグナルを活性化する

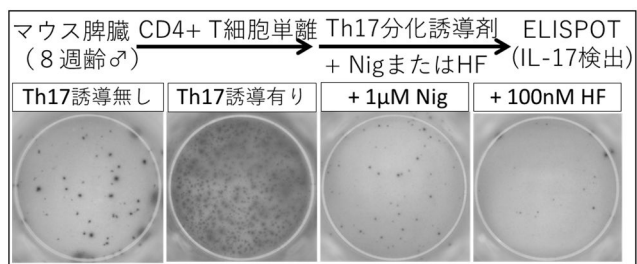


図7: NigはIL-17産生を阻害する

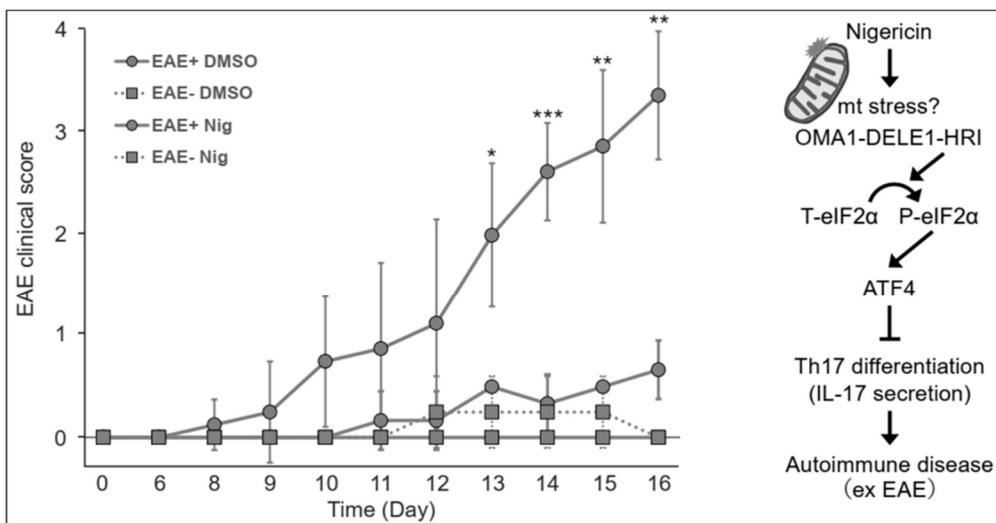


図8: NigはEAE病態スコアを改善する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Bando Tetsuya, Okumura Misa, Bando Yuki, Hagiwara Marou, Hamada Yoshimasa, Ishimaru Yoshiyasu, Mito Taro, Kawaguchi Eri, Inoue Takeshi, Agata Kiyokazu, Noji Sumihare, Ohuchi Hideyo	4. 巻 149
2. 論文標題 Toll signalling promotes blastema cell proliferation during cricket leg regeneration via insect macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1 - 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199916	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 Kitakaze Keisuke, Oyadomari Miho, Zhang Jun, Hamada Yoshimasa, Takenouchi Yasuhiro, Tsuboi Kazuhito, Inagaki Mai, Tachikawa Masanori, Fujitani Yoshio, Okamoto Yasuo, Oyadomari Seiichi	4. 巻 54
2. 論文標題 ATF4-mediated transcriptional regulation protects against -cell loss during endoplasmic reticulum stress in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101338 ~ 101338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101338	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 板東哲也; 奥村美紗; 濱田良真; 大内淑代	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 4
3. 書名 フタホシコオロギが解き明かす免疫と再生の思いがけない関係	

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫に働くToll受容体がコロナの再生を促進するメカニズムを解明
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id900.html
徳島大学 先端酵素学研究所 生体機能学分野
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmb/DMB/homu.html>
researchmap
<https://researchmap.jp/HamadaYoshimasa>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------