

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790333

研究課題名(和文) SIK3シグナルを介した免疫調節機構の解明と新規抗炎症物質の探索

研究課題名(英文) Evaluation of a role of SIK3 on immune system and screening of novel anti-inflammatory molecules

研究代表者

佐野坂 真人 (Sanosaka, Masato)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：30510515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：SIK3-KOマウスは極度の肝障害を呈す。それに伴って炎症性物質が分泌されており、マクロファージの活性化が示唆された。本研究において新たな炎症制御法を開拓することを目的に、SIK3-KOのマクロファージを単離し、その特性を解明した。さらにSIK3シグナルを制御する物質の探索を行った。SIK3-KOマウスより単離したマクロファージにおいては、特定の炎症性分泌が上昇していた。さらに、SIK3シグナルを制御する物質としてプテロシンを同定した。プテロシンはマクロファージの活性を抑制する傾向を示し、新規の抗炎症物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：SIK3-KO mice exhibit excessive liver injury accompanied with the secretion of pro-inflammatory molecules. This observation is suggested the activation of macrophages. In order to discover a novel strategy to control an inflammation, we evaluated the properties of macrophages prepared from SIK3-KO mice. SIK3-KO macrophages secrete the specific inflammatory molecules compared to wild type mice. Furthermore, we identified pteroin as a SIK3-inhibitor. Pteroin inhibited inflammation of macrophages and it was suggested that pteroin is a new anti-inflammatory molecules.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病の多くが慢性炎症を伴っていることが知られており、炎症とエネルギー代謝制御の接点が注目されている。細胞内の生体エネルギーの量の低下を感知して機能するシグナル因子としてはタンパク質リン酸化酵素 AMPK が知られており、炎症制御にも関わっている。

(2) 我々は、AMPKファミリーに属する塩誘導性キナーゼ(SIK)の生理的意義について遺伝子破壊マウスを利用して解明してきた。特に3番目のアイソフォームSIK3のKOマウスは肥満に抵抗性を示し、肝障害に伴って肝臓での炎症性サイトカインの発現が亢進していた。しかし、肝臓において炎症性サイトカインへの反応性が低下していた。また欠損マウスから単離した初代培養肝細胞においても炎症性サイトカインに低応答であった。

## 2. 研究の目的

(1) SIK3 のシグナル伝達経路と免疫制御シグナル伝達経路との関連性を明らかにすること。

(2) SIK3活性を制御する物質を探索し、新規の抗炎症薬の開発に向けた基盤的な情報を提示すること。

## 3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞株を用いて、LPS 刺激に伴う SIK ファミリー遺伝子の発現を検討した。また、この細胞株に SIK3 を強制発現し、LPS 刺激に伴う炎症性サイトカインの発現を検討した。

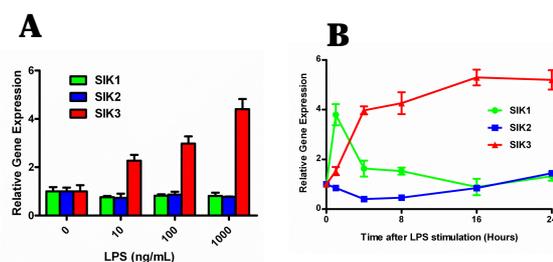
(2) SIK3-KO マウスおよび野生型マウス

からチオグリコレート誘導腹腔内マクロファージを単離し、LPS 刺激に伴う炎症性サイトカインの発現を検討した。

(3) レポーターアッセイにより SIK3 を制御する低分子をスクリーニングした。

## 4. 研究成果

RAW264.7 細胞に LPS を処理し、SIK1-3 の mRNA 発現変動を検討した (Fig.1A)。SIK1 は処理後素早く誘導され、4 時間後には元の発現量に戻った。SIK2 は発現抑制の傾向が観察された。SIK3 は LPS 処理後 4 時間から誘導が顕著となり、24 時間後でも高い発現が維持された。次に RAW 細胞における SIK1-3 の mRNA 発現変動の LPS の濃度依存性を誘導後期で判定した。その結果、SIK3 mRNA は LPS-10ng/ml から誘導がかかることが明らかとなった (Fig.1B)。SIK1 と 2 は LPS 処理後期ということもあり、有意な差は検出されなかった。これらのことから、SIK3 は RAW 細胞において、LPS 感受性因子の 1 つであることが示唆された。



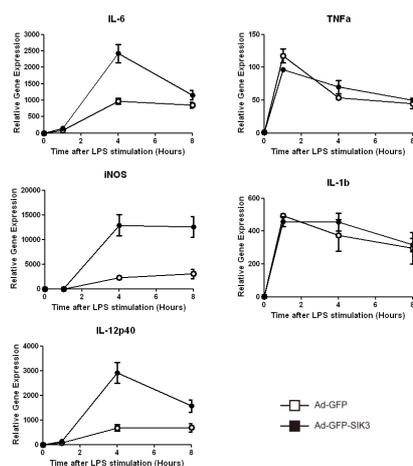
**Figure 1. RAW264.7 マクロファージにおける SIK3 mRNA 発現の LPS 濃度および刺激時間依存的変化**

続いて SIK3 がマクロファージにおいてサイトカイン等の発現に関与しているか否かを検討した。アデノウイルスを利用して、SIK3 高発現の RAW264.7 細胞集団を確立し、

LPS 処理後の各種サイトカインの mRNA の発現を SIK3 強制発現の有り無しの差として検討した (Fig. 2)。mRNA の発現の差が顕著に現れるものとして、IL-6 と iNOS が挙げられ、その差は LPS 処理後 4 時間が最も顕著であった。また、IL-12p40 の処理後 4 時間では差が観察された。一方で、TNF $\alpha$ 、IL-1beta の mRNA 発現には差が観察されなかった。内因性 SIK3 が LPS 処理 4 時間で 4 倍以上誘導されることから、IL-6 などの SIK3 強制発現依存性が観察された mRNA 発現も処理後 4 時間までは強制発現 SIK3 の影響を受けるが、その後は内因性に増加した SIK3 の影響で強制発現とコントロール RAW264.7 細胞間での差が小さくなったと予想した。一方、SIK 阻害剤を活用した他グループの報告では、SIK3 がマクロファージの分化の方向性を左右する結果、多くの炎症性サイトカインの発現を抑制するこ

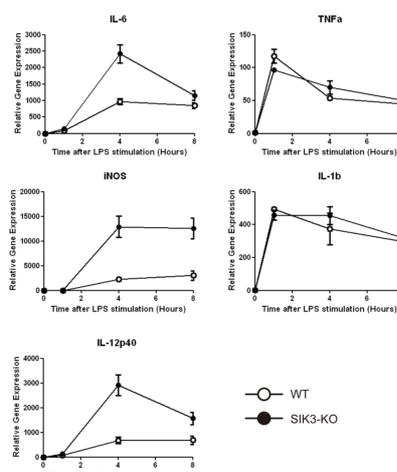
トカインであることが示唆された。

SIK3 強制発現 RAW264.7 細胞では、内因性 SIK3 の影響を排除しきれなかったため、SIK3-KO マウスから単離した腹腔内マクロファージを利用して、反対の現象が観察されるか否かを検討した (Fig.3)。WT(野生型)と SIK3-KO マウスにチオグリコレートを投与することで腹腔内マクロファージを調整した。単離したマクロファージに LPS を投与した後のサイトカイン等の mRNA の量を検討した。強制発現同様に、IL-6、iNOS、IL-12p40 の発現に差が観察され、その差は強制発現と逆になった。TNF-a や IL-1beta の mRNA 変動はやはり、WT と SIK3-KO 由来マクロファージ間で差が観察されなかった。これらのことから、SIK3 はマクロファージにおいて特定のサイトカインの誘導を抑制的に制御していると結論した。



**Figure 2. SIK3 を強制発現した RAW264.7 マクロファージにおける LPS 反応性 (mRNA 発現)**

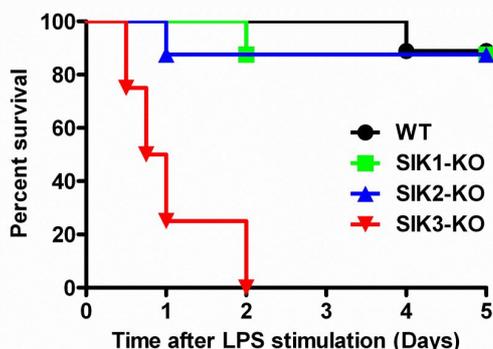
とが報告されている。しかし、今回の結果はそれらの報告とは異なり、SIK3 の影響を受けるサイトカインは IL-6 等の特定のサイ



**Figure 3. SIK3-KO マウス由来腹腔内マクロファージにおける LPS 反応性 (mRNA 発現)**

これらの結果は、SIK3-KO マウスは炎症において抑制系の一部機能が不全状態であることを示唆するものであり、感染症にお

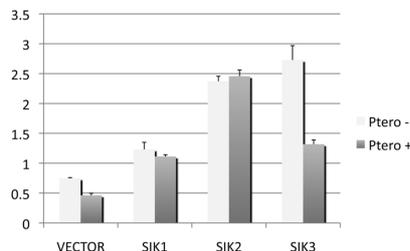
いて極端な炎症反応が予想される。そこで、生体レベルでの LPS の感受性を検討することにした (Fig.4)。SIK3-KO マウスは LPS 投与後 2 日で全ての個体が死亡した。一方、SIK1 や SIK2 の KO マウスは野生型マウスと同様に、LPS 投与で死亡する個体は殆どいなかった。また、それぞれの KO マウス由来のマクロファージの LPS 感受性も検討したが、SIK3-KO のみでサイトカインの発現変動が観察された。これらのことから、SIK のうち、SIK3 だけがマクロファージのサイトカイン発現調節に関わっており、その機能はサイトカイン遺伝子発現の誘導抑制にあると結論した。また、SIK3 が存在しないと、感染症時の炎症が増悪化すると予想する。



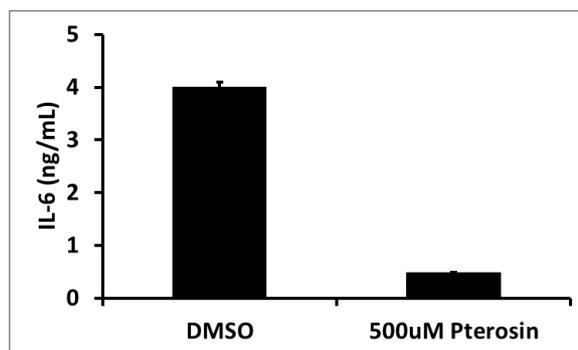
**Figure 4. SIK ファミリー遺伝子のノックアウトマウスにおける LPS 感受性と投与後の生存率**

最後に、SIK3 機能制御を目的に、低分子化合物のスクリーニングを行った。天然物・有機合成物・植物エキストラライブラリーをスクリーニングし、複数の候補低分子化合物を得た。そのうち、プテロシンは HEK293 細胞で SIK3 の下流シグナルを抑制することが明らかとなった (fig.5)。SIK シグナル

の下流として Mef2 を利用し、SIK1-3 で活性化される Mef2 活性を抑制するか否かで判定した。その結果、プテロシンは SIK3 で活性化された Mef2 活性のみを抑制したため、プテロシンは SIK3 シグナルのみを修飾することが示唆された。一方、精製した SIK3 の酵素活性には影響しないことから、プテロシンは SIK3 上流を抑制していると考えている。野生型マウスから調製した腹腔内マクロファージに LPS およびプテロシンを処理したところ、プテロシンは IL-6 分泌を大幅に抑制した (Fig.6)。本研究から、SIK3 が炎症時に誘導され、炎症抑制に機能することが明らかとなった。今後は、SIK3 活性化・不活性化のシグナル状態を研究し、新たな炎症制御法の開発を進めていきたい。



**Figure 5. SIK3 阻害剤としてのプテロシンの同定**



**Figure 6. LPS 刺激した腹腔内マクロファージにおけるプテロシンの作用**

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H:

Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice.

PLoS One. 7(5):e37803, 2012 査読あり

[学会発表] (計3件)

佐野坂 真人、伊東 裕美、藤本 穰、大河原 知治、仲 哲治、竹森 洋  
「SIK3はマクロファージにおける炎症性サイトカインの発現を制御する」  
第85回生化学会大会  
2012.12.16.

Masato Sanosaka, Minoru Fujimoto, Tomoharu Ohkawara, Yumi Ito, Ayako Kumagai, Tetsuji Naka, Hiroshi Takemori

「SIK3 regulates pro-inflammatory cytokine expression in mouse macrophages」  
International Symposium on Transcription and Metabolism  
2013. 11. 12.

Masato Sanosaka, Minoru Fujimoto, Tomoharu Ohkawara, Yumi Ito, Ayako Kumagai, Tetsuji Naka, Hiroshi Takemori

「SIK3 regulates pro-inflammatory cytokine expression in mouse macrophages」  
The 2013 ASCB Annual Meeting, The American Society for Cell Biology  
2013. 12. 17.

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐野坂 真人 (SANOSAKA, Masato)  
(独) 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・  
特任研究員

研究者番号：30510515