

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460550

研究課題名(和文)敗血症及び腸炎モデルにおけるCREB制御分子の関与

研究課題名(英文) involvement of CREB regulatory molecule in sepsis and enteritis model

研究代表者

小出 直樹 (Koide, Naoki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：50308962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回、樹状細胞、マクロファージの一酸化窒素合成酵素やTNF- $\alpha$ の発現におけるCREBの役割について、CREBを制御する調節因子に着目し、病態への関与を調べることを目的とした。当初、CREB制御分子(CREM)の一つICERのノックアウトマウスを用いて、CREBのエンドトキシンによる炎症惹起への関与について、調べることを予定していたが、入手、作成が困難なことがわかり、途中で、CREBの特異的阻害剤になりうる分子を探したところ、コノフィリンを見つけて、CREBのエンドトキシンによる炎症惹起への関与について調べることができた。

研究成果の概要(英文)：The effect of conophylline (CNP) on the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) or lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoclast formation was studied in vitro using bone marrow-derived macrophages (BMMs) or the mouse macrophage-like cell line RAW 264.7. CNP lowered the osteoclast maturation markers such as calcitonin receptor, MMP9 and cathepsin K in BMMs, suggesting that CNP would inhibit the process of osteoclast differentiation. CNP inhibited the RANKL-induced expressions of c-Fos and nuclear factor of activated T cells (NFATc1), key transcription factors for osteoclastogenesis. On the other hand, CNP did not inhibit the signaling pathway of NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in RANKL-stimulated BMMs. Interestingly, CNP inhibited RANKL-induced CREB activation that can mediate c-Fos and NFATc1. CNP also inhibited RANKL- or LPS-induced CREB, c-Fos and NFATc1 activation in RAW 264.7 cells.

研究分野：細菌学

キーワード：エンドトキシン マクロファージ CREB

## 1. 研究当初の背景

敗血症ショックや炎症性腸管疾患は重篤な状態では死に至る可能性があるが、現在有効な治療法はない。これらの疾患マウスモデルでは、樹状細胞、マクロファージが病態の早期に重要な役割を果たすことが報告され、とくにそれらが炎症惹起初期に産生する炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  や一酸化窒素の重要性が示唆されている(Trends Mol Med. 11(2):56-63, 2005.等)。TNF- $\alpha$  や一酸化窒素合成酵素(NOS)の発現はエンドトキシン等による刺激で誘導されるが、TLR4-NF- $\kappa$ B 活性化を介したメカニズムがよく知られている。また、上記の炎症マウスモデルにおいても炎症性サイトカインや一酸化窒素の産生において NF- $\kappa$ B の活性化が重要な役割を持っていることがわかっている。

一方で CREB は転写因子として NF- $\kappa$ B とともによく知られているが、上記のマウスモデルではその関与について詳細なことはわかっていない。CREB は細菌が誘導するマクロファージのアポトーシスにおいて NF- $\kappa$ B と同様に重要な因子であることが報告されており(Immunity. 23(3):319-29, 2005.)、敗血症ショックや炎症性腸管疾患のマウスモデルにおけるマクロファージでも重要な役割を有していることが考えられる。そこで本研究では炎症の病態モデルにおける CREB の関与を解析することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹状細胞、マクロファージの一酸化窒素合成酵素や TNF- $\alpha$  の発現における CREB の役割について調べるために、CREB を制御する調節因子に着目し、病態への関与を調べることを目的とした。具体的には CREB 制御因子のノックアウトマウスもしくは CREB を調節する分子を既知化合物から見出し、それらを用いてマク

ロファージが関与する炎症での CREB の役割を明らかにする。

予想される結果と意義として、未解明であった CREB の関与や役割を見いだすことで炎症における CREB の働きや病態メカニズムを解明できる。また、マクロファージ等の TNF- $\alpha$  や一酸化窒素の産生を抑制する分子は、敗血症ショックや炎症性腸管疾患を抑制する可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) CREB および CREB の制御する上流の分子を特異的に阻害する分子の探索:

当初、CREB 制御分子(CREM)の一つ ICER のノックアウトマウスを用いて、CREB のエンドトキシンによる炎症惹起への関与について、調べることを予定していた。しかし、入手・作成が困難なことがわかったため、樹状細胞やマクロファージにおける炎症初期での CREB の役割を調べることを目的として、CREB を阻害する化合物の探索を行った。探索は転写因子としての活性に重要である CREB のリン酸化を指標とした。

(2) マクロファージの炎症における CREB の役割の解明:

CREB を阻害する化合物を用いて、エンドトキシンが誘導するマクロファージ様細胞の破骨細胞への分化における CREB シグナルについて調べた。破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをマーカーとした TRAP 染色で評価し、CREB の下流シグナルについてはウエスタンブロットや ELISA、Real time PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) RANKL または LPS が誘導する破骨細胞分化におけるコノフィリンの CREB を介した抑制:  
破骨細胞は骨髄由来の単球系マクロファージが

分化・融合した多核巨細胞である。本研究ではマウスマクロファージ細胞を用い、RANK ligand (RANKL)もしくはエンドキシンを処理し、破骨細胞への分化を誘導した。

破骨細胞の分化において CREB は必須な因子であることが報告されており、RANKL 刺激によって CREB のリン酸化が誘導されることがわかっている。

一方、CREB の特異的な制御因子を探索して植物由来の低分子化合物コノフィリン(図1)を見出した。コノフィリンはエンドキシンや RANKL によって誘導されるマクロファージの破骨細胞への分化を抑制し、それが CREB を介した NFATc1 を経由したものであることを明らかにした。また、RANKL は RANK-TRAF6 を介して NF- $\kappa$ B や MAPK を活性化することが知られている。コノフィリンはこれらのシグナルを阻害せず、CREB シグナルを抑制する特異的な阻害剤であることを見出した。(雑誌論文 13)

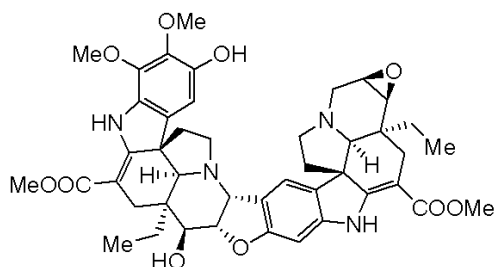


図1 CREB 阻害剤として見出したコノフィリン

(2) DTCM-glutarimide による RANKL もしくは LPS 誘導破骨細胞分化抑制:

CREB の制御する上流の分子を特異的に阻害する分子を探したところ、DTCM-glutarimide(図2)という分子が、Akt を介して、NF- $\kappa$ B を抑制する新規分子であることがわかった。DTCM-glutarimide はこれまでに in vitro および

in vivo で抗炎症活性が見出されている。特に、マウスマクロファージ細胞において一酸化窒素の産生を抑制することが報告されている(Bioorg Med Chem Lett 19:1726-8, 2009.)。本研究では、DTCM-glutarimide がエンドキシンや RANKL によって誘導されるマクロファージの破骨細胞への分化を抑制し、そのメカニズムとして Akt を介して NF- $\kappa$ B を阻害し、破骨細胞分化に必須である NFATc1 を抑制することを明らかにした。(雑誌論文 7)

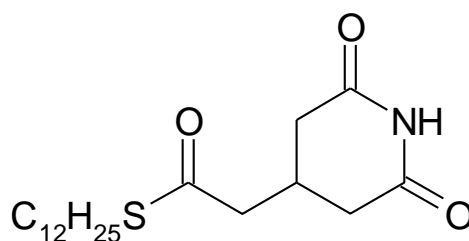


図2 CREB の制御する上流の分子を阻害する DTCM-glutarimide

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

(関連の論文は計 19 件 19 件を表示)

1. Sidthipong K, Ma J, Yu WL, Wang YF, Kobayashi S, Kishino S, Koide N, Yokochi T, Kato K, Okada S, Umezawa K: Rational design, synthesis and in vitro evaluation of novel exo-methylene butyrolactone salicyloylamide as NF- $\kappa$ B inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 27(3): 562-566, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.017
2. Kato Y, Naiki Y, Komatsu T, Takahashi K, Nakamura J, Koide N: A Wnt Pathway Activator Induces Apoptosis and Cell Death in Mouse Monocytic Leukemia Cells. Oncol Res. 25(4):

- 479-483, 2017. DOI: 10.3727/096504016X14721731148893
3. Ando T, Komatsu T, Naiki Y, Takahashi K, Yokochi T, Watanabe D, Koide N: GSK2656157, a PERK inhibitor, reduced LPS-induced IL-1 production through inhibiting Caspase 1 activation in macrophage-like J774.1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 38(4): 298-302, 2016. DOI: 10.1080/08923973.2016.1192191
4. Ando T, Komatsu T, Naiki Y, Yokochi T, Watanabe D, Koide N: Pretreatment of LPS inhibits IFN- $\gamma$ -induced STAT1 phosphorylation through SOCS3 induced by LPS. *Biomed Pharmacother.* 76: 1-5, 2015. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.10.019
5. Naiki Y, Komatsu T, Koide N, Dagvadorj J, Yoshida T, Arditi M, Yokochi T: TGF- $\beta$  1 inhibits the production of IFN in response to CpG DNA via ubiquitination of TNF receptor-associated factor (TRAF) 6. *Innate Immun.* 21(7): 770-7, 2015. DOI: 10.1177/1753425915596844
6. Kato Y, Kamiya H, Koide N, Odkhuu E, Komatsu T, Watarai A, Kondo M, Kato K, Nakamura J, Yokochi T: Irbesartan attenuates production of high-mobility group box 1 in response to lipopolysaccharide via downregulation of interferon- $\gamma$  production. *Int Immunopharmacol.* ;26(1): 97-102, 2015. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.03.015
7. Koide N, Kaneda A, Yokochi T, Umezawa K: Inhibition of RANKL- and LPS-induced osteoclast differentiations by novel NF- $\kappa$ B inhibitor DTCM-glutarimide. *Int Immunopharmacol.* 25(1):162-8, 2015. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.01.004
8. Mori D, Koide N, Tsolmongyn B, Nagata H, Sano T, Nonami T, Yokochi T: Poly I:C enhances production of nitric oxide in response to interferon- $\gamma$  via upregulation of interferon regulatory factor 7 in vascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 98:68-73, 2015. DOI: 10.1016/j.mvr.2015.01.003
9. Odkhuu E, Mendjargal A, Koide N, Naiki Y, Komatsu T, Yokochi T: Lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B. *Immunobiology.* 220(1): 136-41, 2015. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.08.010
10. Odkhuu E, Koide N, Tsolmongyn B, Jambalganiin U, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: Involvement of redox balance in in vitro osteoclast formation of RAW 264.7 macrophage cells in response to LPS. *Innate Immun.* 21(2):194-202, 2015. DOI: 10.1177/1753425914524242
11. Odkhuu E, Komatsu T, Naiki Y, Koide N, Yokochi T: Sendai virus C protein inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production through impairing interferon-signaling. *Int Immunopharmacol.* 23(1): 267-72, 2014. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.09.012
12. Kato Y, Kamiya H, Koide N, Odkhuu E, Komatsu T, Dagvadorj J, Watarai A, Kondo M, Kato K, Nakamura J, Yokochi T: Spironolactone inhibits production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide via inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 36(3):237-41, 2014. DOI: 10.3109/08923973.2014.921690

13. Koide N, Kondo Y, Odkhuu E, Ulziisaikhan J, Ukaji T, Yokochi T, Umezawa K: Inhibition of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand- or lipopolysaccharide-induced osteoclast formation by conophylline through downregulation of CREB. *Immunol Lett.* 161(1):31-7, 2014. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.04.006
14. Jambalgaaniin U, Tsolmongyn B, Koide N, Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: A novel mechanism for inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production by valproic acid. *Int Immunopharmacol.* 20(1):181-7, 2014. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.032
14. Wakayama S, Haque A, Koide N, Kato Y, Odkhuu E, Bilegtsaikhan T, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: Lipopolysaccharide impairs insulin sensitivity via activation of phosphoinositide 3-kinase in adipocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 36(2):145-9, 2014. DOI: 10.3109/08923973.2014.887096
15. Koide N, Odkhuu E, Naiki Y, Tsolmongyn B, Ito K, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: Augmentation of LPS-induced vascular endothelial cell growth factor production in macrophages by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Innate Immun.* 20(8): 816-25, 2014. DOI: 10.1177/1753425913509291
16. Haque A, Koide N, Odkhuu E, Tsolmongyn B, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: Mouse pyrin and HIN domain family member 1 (pyhin1) protein positively regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  and NO production in macrophages. *Innate Immun.* 20(1): 40-8, 2014. DOI: 10.1177/1753425913481636
17. Koide N, Naiki Y, Odkhuu E, Tsolmongyn B, Komatsu T, Ito K, Yoshida T, Yokochi T: Involvement of oncogenic protein  $\beta$ -catenin in LPS-induced cytotoxicity in mouse mononuclear leukemia RAW 264.7 cells. *Oncol Res.* 21(1): 59-65, 2013. DOI: 10.3727/096504013X13793555706803
18. Tsolmongyn B, Koide N, Jambalgaaniin U, Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: A Toll-like receptor 2 ligand, Pam3CSK4, augments interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide production via a physical association between MyD88 and interferon- $\gamma$  receptor in vascular endothelial cells. *Immunology.* 140(3): 352-61, 2013. DOI: 10.1111/imm.12147
19. Tsolmongyn B, Koide N, Odkhuu E, Haque A, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T: Lipopolysaccharide prevents valproic acid-induced apoptosis via activation of nuclear factor- $\kappa$ B and inhibition of p53 activation. *Cell Immunol.* 282(2):100-5, 2013. DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.04.011
- [学会発表]
1. Kulrawee Sidthipong, 小出直樹, 梅澤一夫: 微生物および植物由来 LPS 機能阻害物質の探索 (若手奨励講演) 第 63 回トキシシンポジウム 2016.7.14-16 天童、山形。
2. 梅澤一夫, 小出直樹: LPS 誘導性炎症反応を阻害する微生物生産物質の探索。(招待講演) 第 62 回トキシシンポジウム 2015.7.8-10 伊勢志摩。
- [図書]
- ありません。

[産業財産権]

ありません。

[その他]

ありません。

## 6. 研究組織

### (1) 代表研究者

小出 直樹(KOIDE Naoki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50308962

### (2) 研究分担者

いません。