

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670061

研究課題名(和文) 内在性リガンド：プロサイモシン による自然免疫機構制御技術開発

研究課題名(英文) Innate immunity regulation by prothymosin alpha -mimetics

研究代表者

植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)

長崎大学・医歯薬総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：00145674

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)：マウス網膜虚血モデルにおいて神経保護蛋白質プロサイモシン (ProTa)の抗神経炎症機能を明らかにした。ProTaの前投与による網膜虚血障害の抑制機構を組織化学、電気生理学的、遺伝子解析により明らかにした。その仕組みには、ミクログリア上のTLR4の活性化とその下流にあるTRIF-IRF3経路誘導が関連し、MyD88-NFκB経路が関連しないことを明らかにした。同等の活性を有する非ペプチド性の低分子化合物を探索するため、IRF3応答遺伝子に制御される分泌型アルカリホスファターゼ;遺伝子発現を利用したHEK293細胞レポーターアッセイ系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Prothymosin alpha; (ProTa) is a robustness protein, which inhibits brain ischemia (injury) -induced neuronal and vascular damages. Using retinal ischemia model in mice, we found that preconditioning treatment with ProTa blocks microglia-mediated neuroinflammation in experiments using histological, electrophysiological and expressed gene analyses. We also clarified the underlying mechanisms through an activation of TLR4-mediated TRIF-IRF3 pathway, but not of MyD88-NFκB pathway. Furthermore, in order to search for small compounds possessing similar beneficial compounds, we successfully developed TLR4-mediated IRF3-responsive reporter assay system based on secretory alkaline-phosphatase activity in HEK293 cells.

研究分野：DAMPsと神経免疫薬理学

キーワード：DAMPs 生理活性物質 受容体 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

1977年に免疫活性を有する生理活性ペプチド Thymosin alpha-1 が胸腺抽出液の Thymosin Fraction V に含まれる事が報告された。1984年には、この同じ画分にこの Thymosin alpha-1 をN末端に持つ前駆体として Prothymosin alpha (ProTa)が同定されたが、ProTa は前駆体ではなく独自の免疫関連生理活性蛋白質としての役割を有することが報告されるようになってきた。この研究の潮流とは別に植田らはラット大脳皮質神経細胞の初代培養上清から神経保護を示す蛋白質としてProTaを発見した (Ueda et al., J Cell Biol. 2007)。その作用はユニークで神経ネクロシスを抑制するものであった。明らかにしてきた情報伝達機構にはG蛋白質を介したグルコーストランスポーターの細胞膜への移行によるネクロシス抑制が含まれていたが、その分子同定は未解決であった。ところが、MosoianらがHIV感染ストレスに伴いProT $\alpha$ が細胞外遊離しTLR4を介してHIV複製を抑制することを報告した (Proc Natl Acad Sci U S A. 2010) ことを受け、この仕組みが神経系においても成立しうるかどうかの検証が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、ProTaがTLR4に対する機能性を有するリガンドであるという可能性の検証を分子レベルで検証することが目的である。もし、TLR4を介するシグナル伝達が有為な生理作用、特に神経保護作用に直結するのであれば同様な活性を有する化合物をスクリーニングする、あるいはそのアッセイ系の確立もさらなる目的となる。

## 3. 研究の方法

3-1 QCM (Quartz Crystal Microbalance) 法および Biacore T200 による表面プラズモン共鳴法

リコンビナント ProTa と TLR4-MD2 の蛋白質間相互作用検証に用いる。

### 3-2 分子動力的解析

TLR4-MD2の結晶構造を参考に GROMACS を用い分子動力的解析を行い、TLR4 受容体と ProTa 間の相互作用を 10 ns ごとのシミュレーション解析から、結合様式を推定した。

### 3-3 免疫染色

網膜虚血では非特異的な HE 染色を用い、詳細な細胞種を求める場合は、それぞれの抗体を用いて、細胞種ごとに細胞死を評価した。この中にはミクログリア染色のためには Iba1 を用いた。網膜電位図暗視野条件下の組織像を観察した。

### 3-4 SEAP アッセイ

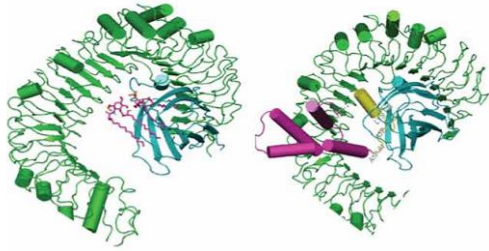
市販のキットを用いて遺伝子発現調節機能の評価に用いた。

## 4. 研究成果

生物物理学的手法による ProTa 作用点候補としての TLR4 受容体の可能性検証

リコンビナント ProTa と TLR4-MD-2 との間の蛋白質間相互作用について QCM (Quartz Crystal Microbalance) 法により検証を行った。LPS を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ずつ順次添加し  $\Delta$  frequency 低下が飽和に達した段階で 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加した時にさらなる低下が認められ、またその逆も得られたことから LPS と ProTa とともに同一の蛋白質に対する相互作用を示すが、厳密には異なる作用部位における結合が予測された。そこで、報告されている TLR4 の結晶構造にもとづくデータをもとに GROMACS というソフトウェアを用いて分子動力的解析を行った時にも同様な結合様式の予測がなされた。

## LPS/TLR4-MD2      ProTa/TLR4-MD2

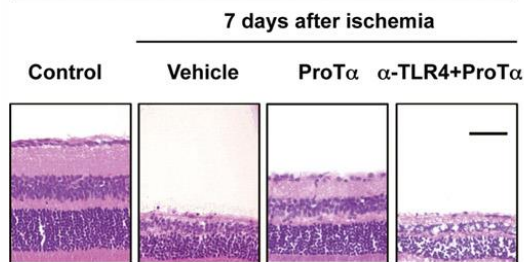


しかしながら、表面プラズモン共鳴法を評価する BiacoreT200 における ProTa と TLR4-MD2 間の相互作用を試みたが、有為な結合は観察されず、その結合強度は必ずしも強力が無い、その反応条件のさらなる改善が必要であるかのいずれかであると結論した。

### 神経生物学的手法による ProTa 作用点候補としての TLR4 受容体の可能性検証

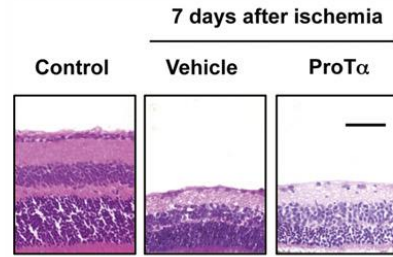
当初 ProTa の硝子体内への投与はマウス網膜虚血モデルにおいて虚血後 24 時間に適用した際に著明な保護効果を示すことを明らかにしてきたが (Fujita et al., Cell Death and Diff. 16: 349-358, 2009)、TLR4 遺伝子欠損マウスにおいて、その保護作用は影響を受けなかった。しかし、自然免疫の可能性を検証するために ProTa の網膜虚血の 2 日前投与を行った時、虚血後 1 週間で評価した HE 染色による組織化学的網膜構造と暗順応下での網膜電位図において 50% 程度の抑制効果を示す事を発見した (Halder et al., J Neurochem. 135:1161-1177, 2015)。

### α-TLR4 pretreatment in WT mice



この効果は TLR4 の中和抗体前投与により完全に消失した。同様の結果は TLR4 遺伝子欠損マウスにおいても観察された。

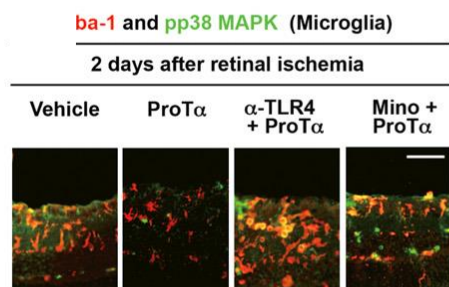
### ProTa preconditioning in TLR4<sup>-/-</sup> mice



この様な保護的効果を調べるために TLR4 下流シグナルに関連する代表的な細胞障害性遺伝子発現への虚血 2 日前 ProTa の影響を虚血後 24 時間後検体から解析した時、TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, MCP-1 のいずれの遺伝子の虚血誘発性発現上昇をも有意に抑制した。これに対し、細胞保護的な遺伝子を解析した時、無処置では IL-1RN, IFIT 1, RANTES, SOCS1, SOCS3, Ship1 の発現は非常に低いレベルであったが、ProTa の前投与はいずれも数十倍以上上昇する事が確認された。興味ある事に LPS についても概ね同様な遺伝子発現上昇が観察されたことである。また ProTa の前投与による細胞保護性遺伝子発現の上昇のうち IL-1RN と IFIT1 遺伝子に関しては TLR4 抗体処置により有意に抑制されることが確認された。こうした遺伝子発現変化は TLR4 の下流のうちでも MyD88-NF $\kappa$ B のシグナルではなく、TRIF-IRF3 のシグナル経路を選択的に駆動させる特異的な機構を含んでいることが示唆された。実際、網膜虚血に対する ProTa の前投与 (Preconditioning) による HE 染色による組織化学的ならびに網膜電位図における機能的保護活性は MyD88 遺伝子欠損マウスでは影響を受けず、TRIF 遺伝子欠損マウスにおいて完全に遮断された。こうした TRIF 選択性の preconditioning による保護活性は LPS でも観察された。

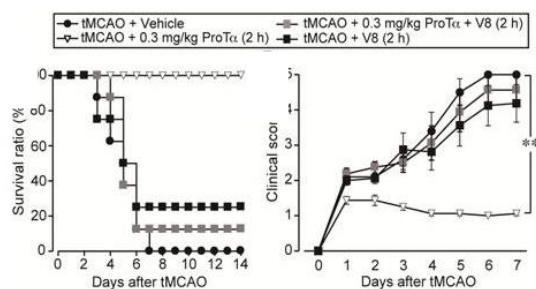
一方、この網膜虚血モデルにおいて ProTa は単独でミクログリアに対し弱い活性化を示す一方、ProTa の preconditioning は虚血誘発性の強力なミクログリア活性化を顕著に抑制するが、この効果は TLR4 の中和抗体

により遮断された。

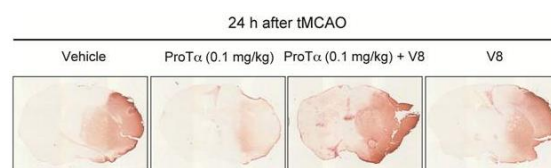


こうした事実から以下の様な機構が示唆された。すなわち、ProTα の preconditioning は網膜に存在する神経免疫細胞ミクログリアの TLR4 を介して細胞保護的なシグナル、すなわち TRIP-IRF3 システムを選択的に活性化し、次に来る虚血誘発性のミクログリア活性化を抑制し保護的な役割を果たす、というメカニズムである。ただし、ProTα は虚血後投与した場合網膜保護はより顕著で有り、その場合の TLR4 の関与は限定的である。

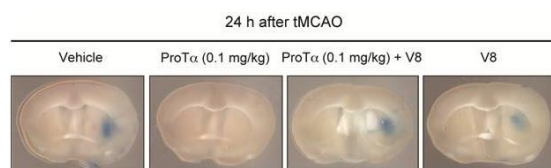
ProTα による、より注目すべき神経保護作用は網膜虚血モデルにおいて観察された。この効果は過去にラット一過性中大脳動脈梗塞/tMCAO モデルとマウス一過性両側総頸動脈閉塞モデル予備的研究として報告しているが (Fujita and Ueda, Cell Death Diff. 14: 1839-1842, 2007)、本研究ではマウス tMCAO を用いて、ProTα の虚血後静脈内 (i. v.) 投与を試みた。神経保護には虚血開始後 2 時間が最大保護効果を示すことが明らかとなり、前例において 2 週間以上の生存が得られ、clinical score においても顕著な保護効果が観察された。V8 プロテアーゼにより ProTα を処置した時にはこの効果は完全に消失したので、蛋白質性の活性によるものである事が確認された。



この様に強力な効果が観察されていることから、神経保護以外の機構の存在を想定し、トマトレクチンによる血管染色を行ったところ、tMCAO により顕著な染色像の低下が観察され、その効果は ProTα 投与により抑制された。この手法における tMCAO 誘発性染色低下は梗塞による血流低下と血管破綻によるトマトレクチンの漏出が考えられたので、tMCAO 後 1 日における IgG 染色を実施したところ、血管から脳への顕著な IgG 漏出が観察され、ProTα による保護が観察された。



この血管脆弱性は 1 日後における Evans Blue 漏出実験においても観察された。



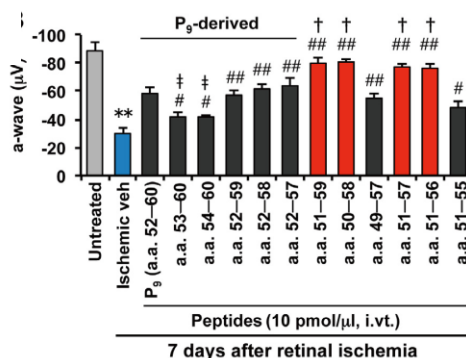
こうした事実から ProTα は虚血性の神経細胞保護のみならず血管保護活性を有することが明らかになった。

臨床への応用を考えたところ、この虚血性血管脆弱性保護は、脳梗塞治療に用いられる血栓溶解剤 tPA を遅く適用した場合に生ずる易脳出血性が標的と考えられた。そこで tPA との併用を予備実験として検討したところミクログリアに対する効果が重要な役割を果たすことが明らかになった。こうした事実

は網膜虚血での TLR4 を介するメカニズムと密接に関係あるものとして今後の大きな研究課題を見いだすことに成功した。

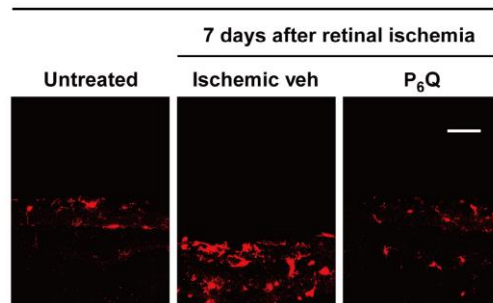
### ProTa 模倣ペプチドの発見

虚血を中心とした神経保護作用を臨床応用するには蛋白質のままでは、コスト面や易抗体形成、エンドトキシン混入など様々な面で不都合が予測できるために、小ペプチド化を試みた。既に 30 アミノ酸 (P30)、ならびに 9 アミノ酸 (P9) からなるペプチドに細胞死抑制や脳虚血障がい保護効果が認められることは報告してきたが (Sebok et al., J Neurochem 125: 713-723, 2013; Peptides 43: 68-75, 2013)、本計画では P9 前後のアミノ酸を活用しより小さなペプチド NEVDQE (P6) を見出した。



さらにはアミノ酸を一部変更することで、NEVDQE (P6Q) を見出し、このペプチドは全身投与でも網膜虚血による組織ならびに機能障害を抑制する作用を有することを見出した。網膜内の各細胞層 (細胞種) に対する保護作用を解析する中で、P6Q にも ProTa と同様な虚血誘発性ミクログリア活性化抑制効果をみだしていることから、今後同様な受容体機構の関与が期待される。

### Iba-1 (Microglia)



### TLR4 受容体を介する生理活性物質のスクリーニング系の確立

先の研究成績から ProTa は一つの作用点として TLR4 に作用し、しかも MyD88-NFκB 経路ではなく、TRIF-IRF3 経路回すると思われるために、低分子非ペプチド化合物の探索のためには両者合わせてのアッセイ系の確立が求められる。そこで 384well ハイスループットスクリーニング (HTS) 系に利用できるレポーター遺伝子評価系を創薬等プラットフォーム事業長崎創薬研究拠点の支援を受けて確立した。TLR4 を発現する HEK293 細胞にさらに NFκB 応答遺伝子あるいは IRF3 応答遺伝子に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子を結合させた細胞をそれぞれ調製した。評価は培養上清中の SEAP に基質を反応させて得られるルシフェラーゼ活性を用いた。NFκB 応答遺伝子を発現する系ではコントロールでは 500 unit にも満たない SEAP 活性であったが、LPS を 0.01 から 10 µg/ml の範囲で作用させたとき、3,000 から 14,000 unit に至る明確なシグナルが観察された。これに対し、IRF 応答遺伝子経路を評価するアッセイ系では基礎値は 20 unit に満たなかったが、代表的な蛋白質 IFNβ の 250 ng/ml を添加すると 500 unit 以上のシグナルが観察された。いずれのアッセイ系において Z' 値は 0.5 以上であり、HTS 系の確立に成功した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Maeda S, Sasaki K, Halder SK, Fujita W, Ueda H: Neuroprotective DAMPs member prothymosin alpha has additional beneficial actions against cerebral ischemia-induced vascular damages, *J Pharmacol Sci*, 査読あり inpress, 2016
2. Kijogi CM, Khayeka-Wandabwa C, Sasaki K, Tanaka Y, Kurosu H, Matsunaga H, Ueda H: Subcellular dissemination of prothymosin alpha at normal physiology: immunohistochemical vis-avia western blotting perspective. *BMC Physiol* .査読あり:2, 2016
3. Ueda H, Halder SK, Matsunaga H, Sasaki K, Maeda S:Neuroprotective impact of prothymosin alpha-derived hexapeptide against retinal ischemia-reperfusion. *Neuroscience*. 査読あり 318:206-218,2016
4. Omotuyi OI ,Ueda H: Energetics and Protomer Communication in the dynamical Structure of S100A13 in Free and Protein-Bound States. *Molecular Simulation*. 査読あり 10.1080/08927022.2015.1091936,2015
5. Omotuyi OI, Matsunaga H, Ueda H: Evidence for ProTa-TLR4/MD-2 binding: molecular dynamics and gravimetric assay studies, *Expert Opin Biol Ther*. 査読あり 15 Suppl. 1: S223-229, 2015
6. Halder SK, Matsunaga H, Ishii K, Ueda H:Prothymosin-alpha preconditioning activates TLR4-TRIF signaling to induce protection of ischemic retina. *J Neurochem*. 査読あり 135:1161-1177,2015

[学会発表] (計 4 件)

1. 前田詩織、佐々木恵太、Sebok Kumar Halder、植田弘師:脳梗塞における神経障害と血管障害を抑制するプロサイモシン $\alpha$ 由来低分子ペプチドの創薬研究、2015年8月27日:日本大学薬学部(千葉県船橋市)
2. Sebok K, Ueda H: Prothymosin alpha implicates microglial TLR4 for the prevention of ischemic damages in retina,第58回日本神経化学学会大会、2015年9月12日:ソニックシティ大宮(埼玉県大宮市)
3. Sebok K, Ueda H: Prothymosin  $\alpha$  concerns TLR4-TRIF signaling in the protection of ischemic retina, Neuroscience 2015,2015年10月20日(アメリカ シカゴ)
4. 植田弘師、佐々木恵太、Sebok Kumar Halder、前田詩織:脳梗塞における神経障害と血管障害を抑制するProthymosin  $\alpha$ 由来低分子ペプチドの創薬研究、第27回日本脳循環代謝学会総会、2015年10月30日:富山国際会議場(富山県富山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件) ○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)

長崎大学・医歯薬総合研究科(薬学系)教授  
研究者番号:00145674

(2)研究分担者

松永 隼人 (MATSUNAGA, Hayato)

長崎大学・医歯薬総合研究科(薬学系)  
客員研究員 研究者番号:20437833

田中 義正 (TANAKA, Yoshimasa)

長崎大学・医歯薬総合研究科(薬学系)  
准教授 研究者番号:90280700