

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ベスナリノンによるTNF- 産生阻害メカニズムの解析
Title(English)	
著者(和文)	堀田健太郎
Author(English)	Kentaro Hotta
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9257号, 授与年月日:2013年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,工藤 明,徳永 万喜洋,十川 久美子,小島 英理
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9257号, Conferred date:2013/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	堀田健太郎
------	-----	---	-----	-------

(要旨)

本論文は「ベスナリノンによる TNF- α 産生阻害メカニズムの解析」と題し、ベスナリノンの tumor necrosis factor (TNF) - α 産生阻害に関連する新規標的タンパク質として、valosin-containing protein (VCP) の同定、また、ベスナリノンが VCP に作用することで、nuclear factor (NF) - κ B 経路の活性化に先立つ活性化抑制因子 I κ B α のプロテアソーム系によるタンパク質分解を阻害し、その下流でおこる TNF- α 産生の低下へとつながる機構の分子レベルでの解析について述べられており、序論を含む全 4 章より構成されている。

第 1 章「序論」では本研究の背景について述べている。内容としてまずベスナリノンが心不全に対し有用な作用を持つ一方、重篤な副作用として顆粒球減少症を発症するためその使用が制限されているなど本薬剤の問題点について述べている。そして、ベスナリノンの顆粒球減少症の作用は造血細胞への直接の作用ではなく、周辺に存在している骨髄支持細胞へ作用することで顆粒球分化誘導因子であるサイトカインや TNF- α の産生を阻害するという過去の作用機序研究の知見も紹介している。加えて、ベスナリノンによる TNF- α 産生阻害の分子機構を明らかにすることを本研究の目的としたことを記している。

第 2 章「ベスナリノン標的タンパク質の探索」では、ベスナリノンによる TNF- α mRNA の産生阻害、及び、アフィニティー精製によるベスナリノンの直接の結合因子 VCP の単離・同定について述べている。骨髄支持細胞 LP101 とヒト胎児腎臓由来細胞 293T を用いた実験から、ベスナリノンによる TNF- α mRNA の産生阻害が、NF- κ B 経路の活性化阻害によることを明らかにし、さらにその作用点が I κ B α の分解阻害であることまでを示している。次いで、LP101 細胞の抽出液を用いた、ベスナリノン固定化磁性粒子によるアフィニティー精製の結果、ベスナリノン標的タンパク質である VCP が結合することを示している。さらに大腸菌発現系での組換えタンパク質、欠損変異体を用いた結合実験により、ベスナリノンが VCP のどの領域に結合するのかについて明らかにしている。

第 3 章「ベスナリノンによる NF- κ B 経路活性化阻害機構の解析」では、ベスナリノンが VCP の機能にどのように影響することで NF- κ B の活性化経路を阻害し、TNF- α を含む NF- κ B 下流遺伝子の発現を抑制するのかについて解析し、その結果について述べている。まず VCP を siRNA によりノックダウンすることによって、NF- κ B 下流遺伝子である TNF- α 、I κ B α 、A20 の mRNA の発現が抑制されることを明らかにし、さらにベスナリノン処理においても、同様の結果が得られたことを示している。次に、VCP のノックダウンと同時に FLAG-I κ B α を発現させた細胞より作成した抽出液をもとに FLAG-I κ B α を濃縮し、検出することで、通常は NF- κ B 活性化に先立って起こる I κ B α の分解が、VCP をノックダウンした 293T 細胞では起こらず、ポリユビキチン化された状態で蓄積することを示している。この現象はベスナリノンにより処理した 293T 細胞においても濃度依存的に起こることを見出している。本結果はプロテアソーム阻害剤 MG132 処理による I κ B α の蓄積と類似していることから、通常であればプロテアソーム系で分解される I κ B α が、ポリユビキチン化からタンパク質分解に至るまでの途中で阻害を受けていることを示唆している。次いで、FLAG-VCP、または、FLAG-I κ B α を発現させた細胞の抽出液により、共免疫沈降実験を実施した結果、VCP は I κ B α 及びプロテアソームと相互作用することを確認し、ベスナリノンが VCP とプロテアソーム間の結合を阻害することを見出している。さらにベスナリノンは VCP と I κ B α 間の相互作用へは影響しないことを明らかにし、ベスナリノンの作用点が、VCP とプロテアソームとの相互作用の阻害であるという結論を得ている。

第 4 章「総括」では第 2 章から第 3 章に渡って得られた実験結果及び知見を総括し、研究の意義、将来の展望を述べている。

これを要するに、本論文はベスナリノンによる TNF- α 産生阻害のメカニズムの一端を解明し、さらには炎症反応等重要な生体内反応を担う NF- κ B 経路の調節因子 VCP の基本機能の解明も進めたという点で、基礎生物学・医学の進展に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

報告番号	乙 第	号	氏 名	堀田健太郎
(要 旨)				
<p>Vesnarinone is a quinolinone derivative developed as an inotropic agent for the treatment of congestive heart failure (CHF). However, the induction of agranulocytosis has been reported as a side effect of vesnarinone, thereby representing a limitation of the usage of vesnarinone. At the molecular level, vesnarinone appears to enhance myocardial contractility by augmenting sodium-calcium exchange, which may responsible for the treatment of CHF. Vesnarinone is also known to inhibit phosphodiesterase III (PDE3), resulting in an increase in the cyclic AMP concentration in cells, leading to vasodilation. Although these pharmacological effects may be related to the treatment of CHF, the molecular basis of the side effect is not well understood.</p> <p>Previous study showed that vesnarinone impairs the production of TNF-α in bone marrow stromal cells, an event that is essential for the differentiation of the cells into mature granulocytes. These finding are also supported by another study that showed that vesnarinone suppressed both the activation of the transcription factor NF-κB and the expression of the TNF-α gene, a target of NF-κB. These findings raised the possibility that the inhibition of NF-κB signaling by vesnarinone may cause the observed agranulocytosis.</p> <p>To investigate the mechanism by which vesnarinone inhibits the activation of NF-κB, we attempted to purify a vesnarinone-binding protein with high-performance affinity magnetic beads, which are powerful tools for the identification of the molecular targets of many drugs. Indeed, a valosin-containing protein (VCP) was identified as a result of our application of this method. It is thought that VCP plays important roles in ubiquitin-dependent protein quality control and intracellular signalling pathways. This study further showed that VCP is essential for the ubiquitin-dependent proteasome-mediated degradation of IκBα and that vesnarinone induces the accumulation of ubiquitinated IκBα resulting in the inhibition of NF-κB activation by preventing the interaction between VCP and the 26S proteasome.</p>				