

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,小畠 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)	要約
Type(English)	Outline

ベスナリノンによる TNF- α 産生阻害メカニズムの解析

発表者氏名 指導教員名
堀田 健太郎 山口 雄輝

【背景】

ベスナリノンは 1983 年に大塚製薬により開発された強心剤であり、心拍出量を増大させることで心臓の機能を回復する。ベスナリノンはホスホジエステラーゼ (PDE) III 阻害による強心作用に加え、心不全患者において発現量が増加するサイトカインの産生を抑制する作用を有し、複数の側面から強心作用をもたらすことで注目されていた。しかし、ベスナリノンによる副作用として重篤な顆粒球減少症の発生が報告されていることから、その使用は厳格な統制下に置かれている。当研究室ではベスナリノンによる顆粒球減少症についての研究が長年にわたりおこなわれており、顆粒球への分化能を有する白血病細胞株 HL60、骨髄支持細胞株 LP101 の共培養系の実験により、顆粒球への分化には骨髄支持細胞が産生するサイトカインが必要であること、さらにベスナリノンが tumor necrosis factor (TNF)- α の産生を抑制することが明らかとなっている。しかしそのメカニズムはその標的因子の実体を含み未だに不明な部分が多い。そこで本研究では、ベスナリノンが生体内で直接結合する標的因子を同定し、その因子の TNF- α 産生に関する機能を解析することで、ベスナリノンのより詳細な作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

■ベスナリノン標的タンパク質の探索

最初に、ベスナリノンによる NF- κ B 経路の阻害作用を検証した。まずベスナリノン処理により、NF- κ B の標的遺伝子である TNF- α の mRNA 産生が抑制されることを定量 PCR により示した。続いて、NF- κ B レポーターアッセイにより NF- κ B 遺伝子の発現がプロモーターレベルで本薬剤により阻害されることを示した。さらに、NF- κ B 活性化時の活性化阻害タンパク質である IkappaB α を抗 IkappaB α 抗体および抗リン酸化 IkappaB α 抗体によるウェスタンブロットニングにより検証した。その結果、IkappaB α は分解シグナルであるリン酸化を受けながらも、分解が抑制されていることが判明した。以上より、ベスナリノンによる NF- κ B 活性化阻害は、IkappaB α のリン酸化後から、NF- κ B の DNA への結合までの間で起こっていることが示唆された。

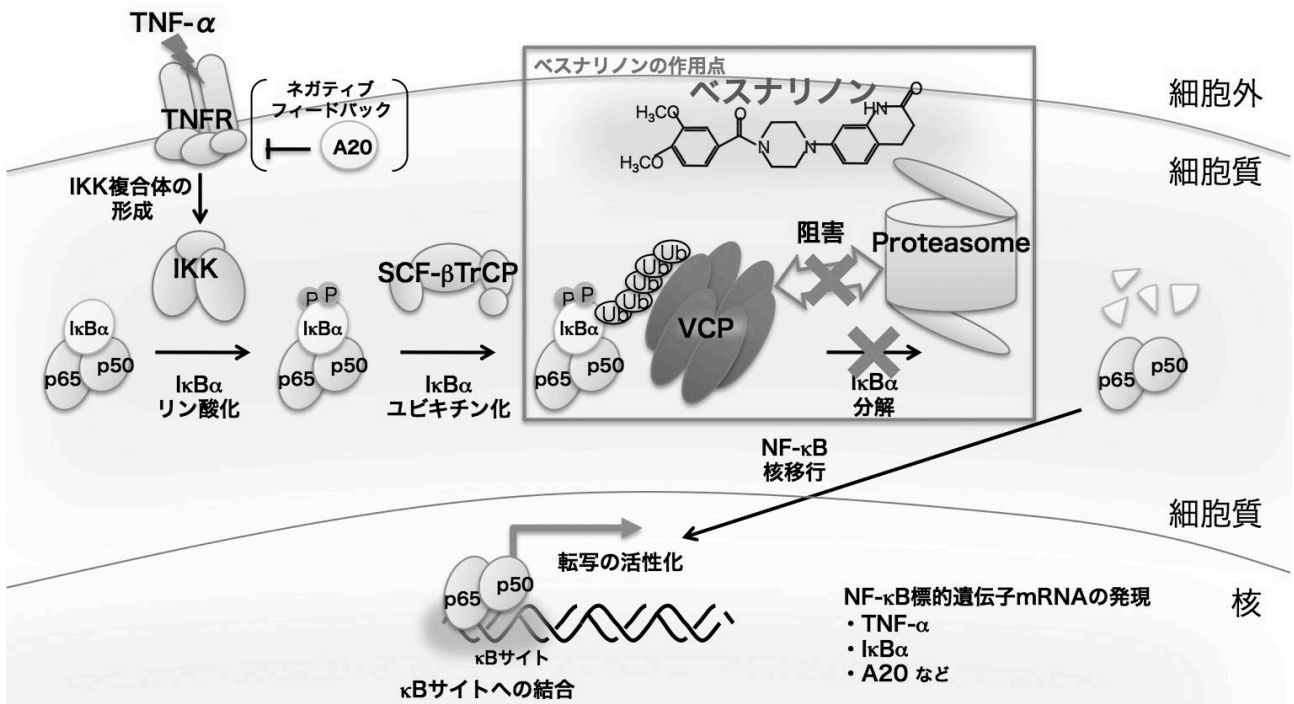
次にベスナリノンによる上記の作用は、どのような分子に結合することが起点となっているかを明らかにするために、ベスナリノンに直接結合する因子を探索することにした。方法は、所属研究室で開発され、薬剤結合因子単離に成功している磁性粒子 FG ビーズを用いたアフィニティ精製法を採用した。本磁性粒子にベスナリノンを固定化したものを用いて、LP101 の細胞抽出液から精

製したベスナリノン結合タンパク質を質量分析計により解析したところ、valosin-containing protein (VCP)が同定された。

■ベスナリノンによるNF-kappaB 活性化阻害機構の解析

VCP がベスナリノンの作用と実際に関係するかどうかを検証するため、VCP を RNAi によりノックダウンした細胞において NF-kappaB 経路を活性化させ、その下流で発現する TNF-alpha, IkappaBalpha, A20 の mRNA 量を定量した。その結果、ベスナリノン処理と同様、いずれの mRNA も発現が強く抑制されていた。VCP はユビキチンプロテアソーム系、小胞体関連分解、細胞周期、DNA 修復などの多くの細胞内活性で重要な活性を持っているタンパク質である。また、NF-kappaB の活性化にはポリユビキチン化された IkappaBalpha の分解が必須であることから、VCP がポリユビキチン化 IkappaBalpha のユビキチンプロテアソーム系での分解に関与する可能性について検証することにした。FLAG-IkappaBalpha を発現する細胞に、ベスナリノン処理、または、VCP ノックダウンを実施し、FLAG-IkappaBalpha を FLAG 精製により濃縮し検出したところ、いずれの系でもポリユビキチン化 IkappaBalpha が分解されずに蓄積した。

VCP はプロテアソームの基質のシャペロンとしてユビキチンプロテアソーム系で、重要な機能を発揮していることが報告されている。これをもとに VCP、IkappaBalpha、プロテアソームの相互作用を VCP-His-FLAG または FLAG-IkappaBalpha による免疫沈降実験を実施した。その結果、ベスナリノンは VCP-IkappaBalpha 間には影響しない一方、VCP-プロテアソーム間の相互作用を阻害した。



本研究結果から明らかとなったベスナリノンの作用機序のモデル図

【結論】

本研究により、ベスナリノンが VCP に作用し、ユビキチンプロテアソーム系の基質となる I κ B α のシャペロンとしての機能を阻害することが示唆され、これが結果的に NF- κ B の活性化を阻害し、TNF- α の産生の阻害へとつながるという結論を得た。本研究を通じて、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することができた。免疫応答・器官形成等の過程で細胞増殖・分化に必須な遺伝子の発現誘導を担い、さまざまな疾病にかかわる NF- κ B 活性化経路の制御にかかわる分子をその制御方式から明らかにしたという点で、本研究は基礎生物学ならびに医学上貢献するところが大きい。

【報文目録】

Hotta, K., Nashimoto, A., Yasumura, E., Suzuki, M., Azuma, M., Iizumi, Y., Shima, D., Nabeshima, R., Hiramoto, M., Okada, A., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Ito, T., Ando, H., Sakamoto, S., Kabe, Y., Aizawa, S., Imai, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, H. and Handa, H. (2013) Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. *Mol. Pharmacol.* 83, 930–938.

【参考文献】

Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. and Handa H. (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327, 1345–1350.