

リンパ球成長因子 IL-15 と類似した低分子化合物の探索と高齢者敗血症治療への応用

In silico screening of interleukin-15 mimetics and application for a treatment of elderly septic patients

米津貴久、渡邊 伸央、水嶋七海、山元文晴、猪口貞樹、井上茂亮
東海大学医学部外科学系・救命救急医学

Nobuo Watanabe, Nanami Mizushima, Sadaki Inokuchi, Shigeaki Inoue

Department of Emergency and Critical Care Medicine

School of Medicine, Tokai University

[要旨]

インターロイキン-15 (IL-15)はNK細胞やT細胞に作用し、細胞増殖や活性化を誘導するサイトカインである。*in silico* スクリーニングによって選抜された候補化合物 15種類において STAT5 リン酸化を指標にアゴニスト(惹起)効果ならびにアンタゴニスト(抑制)効果を測定したところ、化合物 N43 で強い阻害作用(阻害率 32%)を認めた。さらに N6, N15, N35 で弱い阻害作用を認めた。今後はサンドイッチ ELISA 法を活用した IL-15 ミメティクスのスクリーニング系の構築を目指す。

[Abstract]

Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine that acts on NK cells and T cells and induces cell proliferation and activation. Evaluation of the effect on STAT5 phosphorylation of 15 compounds selected by *in silico* screening showed strong antagonistic (inhibitory) effect (inhibition rate 32%) with compound N43. In addition, weak inhibitory effect was observed for compounds N6, N15 and N35. In future, we aim to establish an evaluation system utilizing a sandwich ELISA method.

[Key Words]

IL-15, *in silico* screening, agonist, antagonist

1. はじめに

インターロイキン-15 (IL-15)はNK細胞やT細胞に作用し、細胞増殖や活性化を誘導するサイトカインである。申請者は、IL-15がマウス敗血症モデルにて有効であることを見出した(Inoue et al. J Immunol 2010)。IL-15自

体を敗血症治療薬とすることはコストや安定性の面から難しいため、IL-15受容体に結合し、同様生物活性を有する低分子化合物(ミメティクス)を *in silico* で選抜し治療薬として開発することを目指した。また、IL-15ミメティクスを特異的かつハイスループットに選

別可能な評価系を構築する。

2. 方法

1) *in silico*スクリーニング化合物の IL-15 アゴニスト・アンタゴニスト評価

2016年度 *in silico*スクリーニングによって選抜された候補化合物については、2016年度の評価と同様に NK 細胞由来細胞株 KAI-3 細胞において、ウエスタンブロットとフローサイトメーター(FACS)によって STAT5 活性化作用を測定した。一方、これらの計 15 化合物にアンタゴニスト活性があるかどうか、IL-15 刺激時に共存させた場合にリン酸化 STAT5 の出現を抑制できるかどうか評価した。アンタゴニスト活性が見られた場合、その化合物は IL-15 レセプターへ結合している可能性を示唆する。得られた情報は *in silico*での更なるスクリーニングのための重要な情報となることが期待される。

2) IL-15 レポーターアッセイ系の構築

2016年度樹立した Jurkat 細胞にウイルスベクター等で IL-15 レセプターサブユニット遺伝子(β 鎖、 γ 鎖)を安定発現させ、IL-15 応答性を回復させることを試みた。また同時に、塩野義製薬と共同で、ゲノム遺伝子に容易に挿入される IL-15 レポーターコンストラクトを新たに作成して、IL-15 応答細胞の樹立を試みた。この評価系で得られる結果は、*in silico*での2次スクリーニングにフィードバックし、さらに活性を高めるための分子設計に利用する。このように *in silico* 改変と *in vitro*評価を繰り返し、リード化合物を選抜する。

3. 研究成果の概要

1) *in silico*スクリーニング化合物の IL-15

アゴニスト・アンタゴニスト評価

2016年度 *in silico*スクリーニングによって選抜された候補化合物 50 のうち、購入可能な化合物は 15 種類であった。これらの 15 の化合物で IL-15 受容体に対して、STAT5 リン酸化を指標に化合物スクリーニングをおこなったが、アゴニスト効果を有する化合物は認められなかった。しかしながらアンタゴニストとして、化合物 N43 で強い阻害作用(阻害率 32%)を認めた。さらに化合物 N6, N15, N35 で弱い阻害作用を認めた。今後は、再現性の確認ならびに、阻害効果のあった N43 を中心に、培養時間・濃度など至適条件を検討するとともに、HTS 評価系(*in vitro* IL-15 活性評価系)も構築していく予定である。さらに自己免疫疾患のマウスモデルで *in vivo* 評価も検討している。

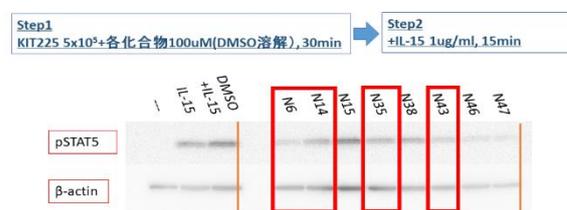


図1 ウエスタンブロットによる *in silico* screening 化合物の IL-15 アンタゴニスト評価
化合物 N43 で強い阻害傾向と、N6, N15, N35, N47 にて軽度の阻害効果を認めた。

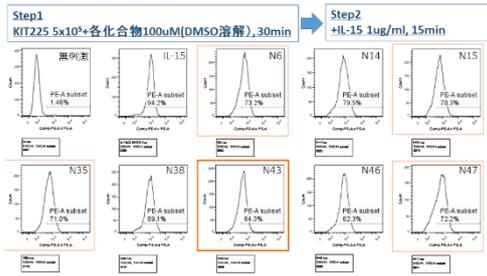
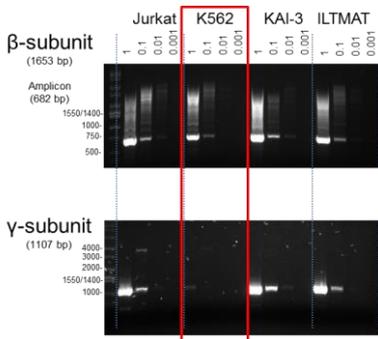


図2 フローサイトメトリーによる *in silico* screening 化合物の IL-15 アンタゴニスト評価
化合物 N43 で強い阻害傾向と、N6, N15, N35, N47 にて軽度の阻害効果を確認した。

K562細胞におけるIL-2R γ の発現欠如



Jurkat T cell IL-2R γ の変異



図3 IL-2 レセプター遺伝子の発現レベル mRNA を逆転写後、段階希釈し、IL-2 レセプター β 鎖(上段)ならびに γ 鎖(中段)の発現レベルを PCR にて測定した。Jurkat T 細胞の IL-2R γ 鎖の DNA シークエンシングの結果、Thr220 が Met に置換されていることが判明した(下段)。

2) IL-15 レポーターアッセイ系の構築

IL-15 応答能のある細胞株に、IL-15 応答レポーター遺伝子を導入して安定発現株を樹立し、多数の化合物を同時に評価できる 96 ウェルプレートを用いたハイスループット評価系の確立を試みた。IL-15 レセプターが活性化されると JAK キナーゼの活性化を介して、転写因子 STAT-5 がリン酸化され、転写因子として活性化型となる。そこで STAT5 レポーターコン

ストラクト (STAT5-ルシフェラーゼ-ハイグロマイシン耐性遺伝子、プロメガ社) を IL-15 応答能を有する細胞株 (生存・増殖に IL-2 が必須) である KAI-3 細胞と IL-TMAT 細胞、ならびに对照として白血病細胞である Jurkat 細胞と K562 細胞に、エレクトロポレーションによって導入し、ハイグロマイシン耐性細胞 (遺伝子安定導入細胞) の選択を行った。この結果、

発光

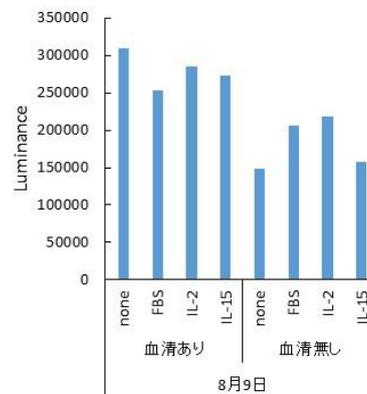


図4 IL-2 レセプターを導入した K562 レポーター細胞のイマチニブ存在下での IL-15 応答性

IL-2R γ K562 レポーター細胞を血清存在下または非存在下で 2 日培養し、引き続き 12 時間イマチニブ処置を行った。その後、IL-15 等で 6 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

完全な不死化細胞である Jurkat 細胞と K562 細胞のみ、STAT5-レポーター遺伝子の安定発現細胞が得られた。しかし、Jurkat 細胞と K562 細胞とも非刺激状態 (血清除去) においても、高いルシフェラーゼ活性を示し、IL-15 または IL-2 を添加しても活性の上昇は見られなかった。

K562 細胞への IL-2 レセプターの γ 鎖遺伝子の導入

Jurkat 細胞は IL-2 レセプターが欠損しているという報告がある。そこで、Jurkat 細胞ならびに K562 細胞の IL-2 レセプターの発現ならびに変異の有無を調べた (図 3)。その結

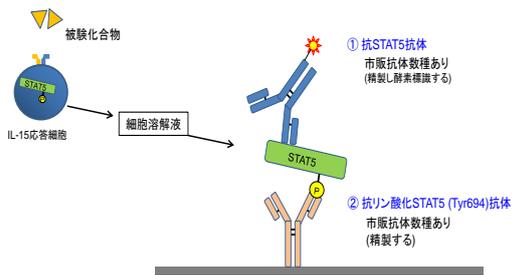


図5 ELISAによるリン酸化STAT5活性化評価系

KIA-3 または ILT-MAT 細胞を IL-15 または IL-15 ミメティクスで刺激後、細胞を溶解する。これを抗リン酸化STAT5抗体が固相化鎖されている96ウェルプレートに添加し、抗リン酸化STAT5を捕捉し、引き続き酵素標識した抗STAT5抗体にて検出する。

果、K562 細胞においては IL-2 レセプターの γ 鎖の発現が欠如していることが判明した。一方、Jurkat 細胞については、 γ 鎖遺伝子は発現しているが点変異があり、この結果 Thr220 が Met に置換されることが判明した。そこで、IL-15 を応答性のある KAI-3 細胞から変異のない γ 鎖の cDNA をクローニングし、レンチウイルスベクターを用いての導入を試みた。K562 細胞においては、遺伝子導入後、 γ 鎖の安定発現細胞をフローサイトメーターにて分離し、安定発現細胞の樹立に成功した。一方、Jurkat 細胞は我々が用いた最大のウイルス濃度においても遺伝子導入はできなかった。

イマチニブ処理の効果

γ 鎖導入 K562 細胞の IL-2 ならびに IL-15 応答性を測定した。しかしながら、この細胞は未処置の状態でも依然として高いルシフェラーゼ活性を示し、IL-15 の添加によって活性の上昇は見られなかった。

慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞である K562 細胞は、チロシンキナーゼ c-Ab1 が Bcr と融合し、恒常的に活性型の Bcr-Ab1 となっている。STAT-5 は Bcr-Ab1 の基質の一つとして報告さ

れているため、非刺激時でも見られる高いルシフェラーゼ活性が Bcr-Ab1 活性に起因している可能性が考えられた。そこで、Bcr-Ab1 の阻害剤であるイマチニブを添加してルシフェラーゼ活性低下するか検討した。その結果、イマチニブ添加後 12 時間以降においてルシフェラーゼ活性が低下することが判明した。そこで、12 時間のイマチニブ処理により Bcr-Ab1 を阻害した後で IL-15 で刺激を行い、ルシフェラーゼ活性が上昇するか調べた。しかし、この状態の細胞も IL-15 刺激によるルシフェラーゼ活性上昇は見られなかった (図4)。

4. 展望

IL-15 アンタゴニスト評価においては、再現性の確認ならびに、阻害効果のあった化合物 N43 を中心に、培養時間・濃度など至適条件を検討するとともに、HTS 評価系 (*in vitro* IL-15 活性評価系) を構築していく予定である。さらに自己免疫疾患のマウスモデルで *in vivo* 評価も検討している。

また本年度 STAT5 応答レポーター遺伝子の発現を指標として IL-15 ミメティクスの HTS 系の構築を試みた。しかし、IL-15 応答細胞では、レポーター遺伝子の導入した安定発現細胞の樹立が困難であった。今後はサンドイッチ ELISA 法を活用した評価系の確立を目指す (図5)。

5. 業績

1. Yatabe T, Inoue S, Sakaguchi M, Egi M: The optimal target for acute glycemic control in critically ill patients: a network meta-analysis. *Intensive Care Med* 2017, 43:16-28.
2. Watanabe N, Suzuki Y, Yonezu T, Nakagawa Y, Shiina T, Hirayama N, Inokuchi S, Inoue S: A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule. *Sci Rep* 2017, 7:6798.

3. Sawamoto T, Aoki H, Otsuka H, Morita S, Inoue S, Nakagawa Y, Inokuchi S: Successful Treatment of Blunt Musculophrenic Artery Injury by Transcatheter Arterial Embolization: A Case Report. *Tokai J Exp Clin Med* 2017, 42:126-129.
4. Sato F, Nakagawa K, Kawauchi A, Matsubara A, Okegawa T, Habuchi T, Yoshimura K, Hoshi A, Kinoshita H, Miyajima A, et al.: Laparoendoscopic single-site surgeries: A multicenter experience of 469 cases in Japan. *Int J Urol* 2017, 24:69-74.
5. Okazaki T, Hifumi T, Kawakita K, Shishido H, Ogawa D, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Inoue S, Tamiya T, et al.: Serial blood lactate measurements and its prognostic significance in intensive care unit management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *J Crit Care* 2017, 41:229-233.
6. Morandi A, Piva S, Ely EW, Myatra SN, Salluh JIF, Amare D, Azoulay E, Bellelli G, Csomos A, Fan E, et al.: Worldwide Survey of the "Assessing Pain, Both Spontaneous Awakening and Breathing Trials, Choice of Drugs, Delirium Monitoring/Management, Early Exercise/Mobility, and Family Empowerment" (ABCDEF) Bundle. *Crit Care Med* 2017, 45:e1111-e1122.
7. Kotaki R, Higuchi H, Ogiya D, Katahira Y, Kurosaki N, Yukihiro N, Ogata J, Yamamoto H, Mohamad Alba S, Azhim A, et al.: Imbalanced expression of polycistronic miRNA in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2017, 106:811-819.
8. Kondo Y, Fuke R, Hifumi T, Hatakeyama J, Takei T, Yamakawa K, Inoue S, Nishida O: Early rehabilitation for the prevention of postintensive care syndrome in critically ill patients: a study protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2017, 7:e013828.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり種々のご助言、援助をいただきました東海大学医学部生体防御学・佐藤健人准教授、分子生命科学・椎名隆准教授、再生医学研究センター八幡崇准教授、先進生命科学研究所・平山令明所長、東海大学・教育研究支援センター・タンパク質部門・塚本秀雄博士、細胞生物学部門・岡田義明博士、核酸部門・松澤秀行博士に感謝いたします。