

審査の結果の要旨

氏名 劉 霆

本論文はLapatinibによるinflammasome-caspase-1経路の制御機構についての研究成果を述べたものである。Inflammasome-caspase-1経路は様々なストレスに応答し、炎症性サイトカインIL-1 β の分泌および炎症性細胞死pyroptosisを誘導することで、自然免疫応答に深く関与するが、その制御機構は依然としてまだ不明な点が多い。学位申請者は、ライブイメージングに基づく画期的な化合物スクリーニングおよび関連する実験から、低分子化合物Lapatinibがinflammasomeの一タイプであるNLRP3 inflammasomeを制御することを見いだした。

申請者は、inflammasome-caspase-1経路の分子機構および制御化合物を同定するため、初代培養腹腔マクロファージおよび化合物ライブラリーを用いた化合物スクリーニングを行った。これまでinflammasome-caspase-1経路の分子機構解明を目指したスクリーニング研究の多くはIL-1 β 分泌を指標としていたが、申請者は、これらの先行研究との差別化を図るため、細胞死を指標としたスクリーニング系を構築した。申請者は、本学修士課程において、caspase-1活性化をリアルタイムに検出可能なFRETプローブSCAT1を用いたライブイメージング解析により、単一マクロファージレベルでinflammasome-caspase-1経路が全か無かの様式で制御されることを見いだしていた。また、その過程で、caspase-1活性化後にSCAT1の蛍光消失を伴う細胞死が観察されることも明らかにしていた。申請者は、この蛍光消失の表現型が非常に劇的であるため、目的のスクリーニングの指標として適すと判断した。化合物ライブラリーには本学創薬機構のValidated Compound Libraryを用いていた。このライブラリーは活性が既知の化合物およびoff-patentの薬剤で構成されており、候補化合物を絞り込んだ後の機能解析が比較的容易であると考えた。実際のアッセイ系は、化合物を予め添加した96ウェルプレートにSCAT1を発現する腹腔マクロファージを蒔種し、AIM2 inflammasome活性化刺激であるpoly(dA:dT)刺激前後におけるSCAT1蛍光強度変化を、全自動イメージアナライザーによって単一細胞レベルで検出するというものであった。構築したスクリーニング系は、ハイスループットスクリーニングにおける系の安定性を評価するZ'-factorが0.78と高い値を示したため、信頼性の高いアッセイ系であると考えられる。このスクリーニング系を用いて申請者は、約3400の化合物から偽陽性を除いた66の1次候補化合物を得ていた。その後、SCAT1ライブイメージング解析によるcaspase-1活性化評価やELISAによるIL-1 β 分泌評価、LDH放出による細胞死評価を行い、最終的にinflammasome-caspase-1経路を制御する可能性がある8つの候補化合物を同定した。

申請者は、8つの候補化合物のうち、未知の機構でpoly(dA:dT)刺激によるAIM2 inflammasome活性化に関与する可能性があったLapatinibに着目した。LapatinibはEGFRおよびHer2の二重チロシンキナーゼ阻害剤であり、がんに対する分子標的治療薬として臨床で使用されている。しかしながら、申請者は、スクリーニング時に得られたLapatinibによるAIM2 inflammasome活性化に対する効果を再現できなかった。そこで、申請者は、他のinflammasomeであるNLRP3 inflammasomeに対するLapatinibの効果を検討したところ、LapatinibがNLRP3 inflammasome刺激によるIL-1 β 分泌および細胞死を抑制することを見出した。また、LapatinibがNLRP3 inflammasome刺激によるcaspase-1活性化、inflammasomeを構成する因子であるアダプタータンパク質ASCの多量体化、そして、NLRP3とASCの生化学的相互作用を阻害することも明らかにした。さらに、Lapatinibがもつ阻害効果がEGFRを介するかについて検討するため、ErlotinibやGefitinibといったEGFR阻害剤がNLRP3 inflammasome活性化を阻害するか確認したところ、これらの阻害剤は直接的な阻害効果を有さないことがわかった。同様に、EGFの過剰投与はNLRP3 inflammasome活性化を増強しないこと、およびLapatinibによる阻害効果を回復させないこと

も確認していた。

本論文で申請者は、Lapatinib が EGF-EGFR を介さずに NLRP3 inflammasome の形成を阻害することを明らかにした。NLRP3 inflammasome の制御異常は多くの炎症性疾患、代謝性疾患および神経性疾患の病態に関与することが知られている。Lapatinib がどういった分子を標的にしてその阻害効果を発揮しているかについてはまだ不明だが、本論文で得られた知見は NLRP3 inflammasome の新たな制御機構の解明および Lapatinib によるがん以外の病態に対する治療効果の可能性を示唆するものである。また、IL-1 β などの炎症性サイトカインはがん微小環境形成に大きく関与するため、本論文は Lapatinib がもつ抗がん作用の新たな分子機構を示唆する知見となり得る。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。