

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】令和3年8月25日(2021.8.25)

【特許番号】特許第6906826号(P6906826)

【登録日】令和3年7月2日(2021.7.2)

【特許公報発行日】令和3年7月21日(2021.7.21)

【年通号数】特許・実用新案公報2021-029

【出願番号】特願2020-523259(P2020-523259)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 29/00 1 0 1

A 6 1 P 19/02

A 6 1 K 45/00

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/48 Z

G 0 1 N 33/53 D

【記】別紙のとおり

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6906826号
(P6906826)

(45) 発行日 令和3年7月21日 (2021.7.21)

(24) 登録日 令和3年7月2日 (2021.7.2)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00

請求項の数 5 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-523259 (P2020-523259)	(73) 特許権者	513246872
(86) (22) 出願日	平成30年12月10日 (2018.12.10)		ソウル大学校産学協力団
(65) 公表番号	特表2021-501315 (P2021-501315A)		SEOUL NATIONAL UNIV
(43) 公表日	令和3年1月14日 (2021.1.14)		ERSITY R&DB FOUNDAT
(86) 国際出願番号	PCT/KR2018/015605		ION
(87) 国際公開番号	W02019/208897		大韓民国、08826 ソウル、クアナク
(87) 国際公開日	令和1年10月31日 (2019.10.31)		ーグ (シリムドン)、クアナクーロ、1
審査請求日	令和2年4月24日 (2020.4.24)		1 Gwanak-ro, Gwanak-
(31) 優先権主張番号	10-2018-0047355		gu, Seoul 08826, KORE
(32) 優先日	平成30年4月24日 (2018.4.24)		A
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)	(74) 代理人	100121728
			弁理士 井関 勝守
		(74) 代理人	100165803
			弁理士 金子 修平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PKC α -LSD1-NF κ B経路を標的にする炎症反応調節剤スクリーニング方法用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

PKC α 、LSD1及びNF- κ Bを発現する細胞を提供する段階；

前記細胞にNF- κ B媒介された炎症反応を誘発することができる刺激を処理する段階で、前記処理によって前記細胞でPKC α →LSD1→NF- κ B経路による炎症反応が誘発されて、

前記細胞に前記経路による炎症反応を抑制すると期待される試験物質を処理する段階；及び

前記処理結果、前記試験物質で処理されなかった対照群と比較して前記試験物質で処理された細胞で前記経路による炎症反応が抑制された場合、前記試験物質を炎症反応抑制候補物質として選別する段階を含み、

前記経路による前記炎症反応の抑制は、前記LSD1のリン酸化減少、前記NF- κ Bのp65サブユニットの脱メチル化の抑制または前記LSD1と前記p65サブユニットの結合減少の中の一つ以上で測定されるものである、NF- κ Bによって媒介される炎症反応抑制剤スクリーニング方法。

【請求項2】

前記NF- κ B媒介された炎症反応を誘発することができる刺激は、TNF α (tum or necrosis factor α)、IL-1 β (interleukin 1-beta)、PAMP (pathogen-associated molecular pattern) またはバクテリアLPS (lipopolysaccharide

s)である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞は、Raw 264.7またはBMDM (bone marrow-derived macrophage)である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記PKC α 、LSD1及びNF- κ Bを発現する細胞の代りに、前記細胞はヒトを除いた動物モデルとして提供される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の方法によって選別された前記炎症反応抑制候補物質を、敗血症、自己免疫疾患またはリウマチ関節炎治療剤の製造のために使用する、治療剤の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

炎症調節機序を基にする治療剤開発に関連する技術分野である。

【背景技術】

【0002】

NF- κ Bシグナルによって媒介される炎症反応は、病原菌の侵入に対する宿主の防御に必須である。NF- κ Bシグナル伝達の調節メカニズムはよく研究されたが、このような炎症反応の後成的な調節はあまり知られていない。

20

【0003】

特に炎症反応による敗血症は、致死率が70%に達して集中治療室入院患者の20%を占めて全世界的に一日に1500人以上死亡する深刻な疾患である。しかしながら、他の疾病に比べて死亡率が相当高いにも関わらず、未だ特別な治療薬が開発されていない。現在販売中の唯一の敗血症治療剤は、多国籍製薬会社リリー (Eli Lilly CO.) のジグリス (Xigris) がある。ジグリスは、活性化したプロテインCと類似の物質で炎症を低くし、血液凝固を緩和させる。この治療剤の場合、2001年感染による高い死亡危険がある成人患者に使用が承認されたが、小児臨床実験の結果ジグリス (Xigris) は、重症血液感染小児に効果がなく頭の出血などの深刻な副作用を誘発して臨床実験を中断させた状態である。

30

【0004】

近年敗血症から見える初期過度な先天性免疫反応が免疫反応不能 (immunoparalysis) を誘導して、大多数の死亡患者の場合に初期過度な免疫反応による死亡よりは一次病原菌あるいは二次病原菌に対抗した免疫反応不能によって死亡すると報告された (Docke, W. D. et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. Nature Med. 3, 678-81 (1997))。このような結果は、初期炎症性サイトカインの抑制技術だけでは敗血症の治療に限界があることを示す。

【0005】

40

従って、安全で高い治療効果を得ることができる様々な機序に基づいた新しい薬剤開発が切実な状況である。

【0006】

敗血症は、エンドトキシン (endotoxin) のようなバクテリア生成物がToll様受容体 (Toll-like receptor) に結合して始まり、アダプタ分子を介してシグナリングが中継されて、NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) を含む転写因子 (TF) までシグナルが続くことが知られている (Abraham, J. Infect. Dis. 2003; 187: S364-S369; Tiruppathi et al., Nat. Immunol. 2014; 15: 2392-47)。全

50

身性炎症疾患で炎症関連した分子中一つであるNF- κ Bシグナル伝達は、炎症反応を微調整するために必ず精巧に調節されなければならない (Caldwell et al., Genes Dev. 2014; 28: 2120-2133)。

【0007】

米国公開特許公報第2009-0317833号は、TLR4 (toll-like receptor) 細胞内領域に結合する物質のスクリーニング方法に関し、NF- κ Bによって転写が調節されるTLR4に結合してTLR4に対するシグナル伝達経路を遮断して炎症を調節する機序を開示する。

【0008】

しかし、免疫体系が病原菌露出の強度と露出の持続期間をどのように感知するのか、または、どのようなシグナル伝達経路またはシグナルカスケードが追加的な活性化を決めるのかに対する分子的メカニズムを根拠とした治療剤の開発が必要である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本願は、新しい炎症反応誘発機序に基づいた治療剤スクリーニング方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一様態で本願は、PCK α 、LSD1及びNF- κ Bを発現する細胞を提供する段階；前記細胞にNF- κ B媒介された炎症反応を誘発することができる刺激を処理する段階で、前記処理によって前記細胞でPCK α →LSD1→NF- κ B経路による炎症反応が誘発されて、前記細胞に前記経路による炎症反応を抑制すると期待される試験物質を処理する段階；及び前記処理結果、前記試験物質で処理されなかった対照群と比較して前記試験物質で処理された細胞で前記経路による炎症反応が抑制された場合、前記試験物質を炎症反応抑制候補物質として選別する段階を含み、前記経路による前記炎症反応の抑制は、前記LSD1のリン酸化減少、前記NF- κ Bのp65サブユニットの脱メチル化の抑制または前記LSD1と前記p65サブユニットの結合減少中一つ以上で測定されるものである、NF- κ Bシグナルによって媒介される炎症反応抑制剤スクリーニング方法を提供する。

20

【0011】

一実現例で前記PCK α →LSD1→NF- κ B経路によるNF- κ B媒介された炎症反応を誘発し得る刺激は、刺激を受容する受容体は異なるが、PCK α →LSD1→NF- κ B経路NF- κ Bによる経路を活性化または誘発または触発及び増幅させることができる刺激で、TNF α (tumor necrosis factor α)、IL-1 β (interleukin 1-beta)、PAMP (pathogen-associated molecular pattern) またはバクテリアLPS (lipopolysaccharides) のような免疫状況特異的に作用する刺激である。

30

【0012】

一実現例で本願に係る方法に使用することができる細胞は、マクロファージ、たとえばマウスマクロファージ由来であるRaw 264.7 (mouse leukemic monocyte-macrophage) またはBMDM (bone marrow-derived macrophage) が使用される。

40

【0013】

一実現例で本願に係る方法でPCK α 、LSD1及びNF- κ Bを発現する細胞の代りに、または、前記細胞はヒトを除いた動物モデルとして提供されることができる。

【0014】

本願に係る方法によって選別された候補物質は、NF- κ B媒介された炎症疾患の治療、たとえば慢性炎症疾患敗血症、自己免疫疾患またはリウマチ関節炎治療剤として使用され得る。

【発明の効果】

50

【0015】

NF-κBシグナルによって媒介される炎症反応は、病原菌の侵入に対する宿主の防御に必須である。NF-κBシグナル伝達の調節メカニズムはよく研究されているが、炎症反応の後成的な調節はあまり知られていない。本発明では、炎症反応の活性化と増幅にPKCα-LSD1-NF-κBという新しいシグナル伝達軸が重要であることを確認した。過度な炎症性刺激に反応して、PKCαは核に移動してLSD1をリン酸化させる。LSD1リン酸化は、p65結合に必要であり、p65の脱メチル化を促進してp65タンパク質の安定性を向上させる。本願によると、Lsd1^{SA/SA}マウスを用いたLSD1リン酸化の除去及び野生型マウスでPKCαまたはLSD1活性の抑制が、敗血症が誘発した炎症性肺損傷及び死亡率を減少させることが示された。これは、PKCα-LSD1-NF-κBシグナル伝達カスケードが、炎症反応の制御に重要であることを示し、このようなシグナル伝達を標的にする薬物の開発は、敗血症を含む全身性炎症疾患の治療剤開発に有用に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】LSD1がPKCαによって炎症シグナルに反応してリン酸化されるのを示す。

(A) 野生型とLsd1^{SA/SA}マウスにPBSあるいはLPS（体重1kg当たり10mg注射）を腹腔内注射して6時間以後肺のH&E染色した図（各グループ当たり6匹ずつ実験）である。スケールバー、100μm。見られるイメージは3回の独立実験による代表イメージである。(B) 週齢、重さが類似の野生型（11匹）とLsd1^{SA/SA}マウス（10匹）にLPSを注射した以後72時間生存率をモニターした。（**p<0.01, log-rank test）(C) 野生型とLsd1^{SA/SA}マウスでBMDMを抽出して、LPSを2時間処理した後（あるいはLPSを処理しない）表示された抗体で免疫ブロットした。(D) 野生型とLsd1^{SA/SA}マウス（グループ当たり6匹）で抽出した肺組織の免疫ブロットデータである。マウスは、LPS腹腔注射（体重1kg当たり10mg注射、注射後6時間以後に実験する）1時間前にGo6976（体重1kg当たり1mg注射、corn oilに溶かす）あるいはGo6976の溶媒であるcorn oilを注射した。(E) 表示された時間LPSを処理した後、野生型BMDMで免疫ブロットした結果である。tubulin抗体は、細胞質タンパク質のローディングコントロールとして使用された。laminA/C抗体は、核タンパク質のローディングコントロールとして使用された。(F) BMDM細胞にGo6976を6時間処理したり処理しなかった状態でLPSを2時間処理した。その後核タンパク質だけ分離抽出してPKCαとLSD1の免疫沈降実験を行った。(G) 表示された時間BMDMにLPSを処理して核タンパク質だけ分離して表示された抗体で免疫ブロット実験を行った。(H) LPSを表示された濃度により2時間処理した後BMDMの核タンパク質だけ分離して表示された抗体で免疫ブロット実験を行った。

【図2】LPSで誘発されたLSD1のリン酸化はゲノム全体水準でNF-κB標的遺伝子の活性化に必要であることを示す。(A) RNAシーケンシング分析の戦略を示す流れ図である。(B) 階層的クラスタリング結果3,558個の異なるように発現する遺伝子（Differentially Expressed Gene以下、DEG）を確認した。転写開始位置（Transcriptional Start Site、以下TSS）+/-2.5kbp周辺にp65ピークの有無を描いた。(C) クラスタ1遺伝子のGO（gene ontology）分析によりサイトカインの産生と炎症反応に関連した遺伝子がクラスタ1遺伝子プールで有意に多く分布することを確認した。(D) クラスタ1内の遺伝子のTSS近くにp65ピークに対するDe novo motif分析。Hypergeometric p-値を計算した。(E) 野生型とLsd1^{SA/SA}マウスのBMDMでLPS2時間処理有無によるLSD1リン酸化依存遺伝子のquantitative RT-PCR結果分析である(F) 野生型とLsd1^{SA/SA}マウス（各グループ当たり6匹）の肺組織でLPS6時間腹腔注射有無に応じたLSD1リン酸化依存遺伝子のquantitative RT-PCR結果分析である(G) 野生

10

20

30

40

50

型マウスは、LPS腹腔注射（体重1kg当たり10mg注射、注射後6時間以後に実験する）1時間前にGo6976（体重1kg当たり1mg注射、corn oilに溶かす）あるいはGo6976の溶媒であるcorn oilを注射した（グループ当たり6匹）。マウスの肺組織でLSD1リン酸化依存遺伝子のquantitative RT-PCR結果分析。データは平均±標準偏差で表現された； $n=3$ 、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.001$ （Two-way ANOVA）。

【図3】LPS誘発LSD1リン酸化が標的遺伝子のプロモーターにp65をリクルートするのに必要であることを示す。（A）BMDM細胞でLPSの2時間処理して、p65とLSD1の結合を核タンパク質だけ抽出した以後免疫沈降実験により行った。（B）PKC α の野生型とdominant negative形態を使用したin vitroキナーゼ実験。GST-LSD1とGST-p65をE. coliで精製して基質として使用し。（C）In vitro GST pull down実験は、リン酸化されたGST-LSD1（GST pull down実験が実行される前にPKC α を使用したキナーゼ実験が先行した）とp65を使用して行われた。この時、1,000 unitの λ -phosphatase有無で実験が行われた。（D）野生型とLsd1^{SA/SA}マウスのBMDMでLPS2時間処理による、LSD1リン酸化依存標的プロモーターでのChIP実験。（E）予め6時間Go6976を処理したRaw264.7細胞でLPS2時間処理してLSD1リン酸化依存標的プロモーターでのChIP実験を実行。データは平均±標準偏差で表現された； $n=3$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ （Two-way ANOVA）（D、E）。

【図4】LSD1によるp65の脱メチル化がp65のタンパク質安定化を増大させることを示す。（A）Raw264.7細胞にLSD1のflag tagを有している野生型（WT）、SA、そしてKA突然変異をトランスフェクションしてMG132を4時間処理した後、LPSを2時間追加処理した。この細胞の核タンパク質だけ抽出してp65とWT、SA、KA間の免疫沈降実験を行った。（B）Raw264.7細胞にMG132を4時間処理してLPSを2時間追加して、核タンパク質だけ抽出した以後in vivo脱メチル化実験を行った。p65抗体を用いた免疫沈降実験以後、p65のメチル特異抗体を利用してp65のメチル化を感知した。（C）細胞lysateで基質であるflag-p65を精製して、メチル化酵素としてGST-SET7/9をE. coliで精製して、脱メチル化酵素であるHis-LSD1は、E. coliで精製してin vitro脱メチル化実験を行った。脱メチル化実験前にリン酸化されたLSD1を得るためにPKC α を使用したin vitroキナーゼ実験が先行された。反応物は、SDS-PAGE以後、p65K314/315メチル化を認知する抗体を用いてp65のメチル化を感知した。（D）MG132が4時間予め処理された野生型とLsd1^{SA/SA}マウスのBMDMにLPS追加2時間処理して核タンパク質だけ抽出した以後表記された抗体を用いて免疫ブロット実験を実行した。（E）Raw264.7細胞にLSD1のflag tagを有している野生型（WT）、SA、そしてKA突然変異をトランスフェクションしてMG132を4時間処理した後LPSを2時間追加処理した。このタンパク質抽出物をNi²⁺-NTA beadを使用してpull down下した。p65のユビキチン化はp65抗体を介して検出された。（F）MG132を4時間処理した後LPSを2時間追加処理したRaw264.7細胞でp65抗体を用いて免疫沈降した。p65のユビキチン化はFK2抗体を介して検出された。（G）LSD1リン酸化を媒介したp65の脱メチル化がp65の安定化を引き起こすとの内容の図である。

【図5】PKC α -LSD1リン酸化軸が持続的な炎症反応を調節することを示す。（A）野生型とLsd1^{SA/SA}マウスのBMDMに表記された時間によりLPSを処理して、Mcp-1、Il-6、CebpdのmRNAをquantitative RT-PCRにより検出した。（B）Go6976を野生型マウスのBMDMに6時間先処理した後、表記された時間によりLPSを処理して、Mcp-1、Il-6、CebpdのmRNAをquantitative RT-PCRにより検出した。（C）BMDMでLPSを表記された時間により処理して核タンパク質だけ抽出してp65とLSD1のen

dogenuous 結合状態を確認した (D) 野生型と $Lsd1^{SA/SA}$ マウスの BMDM に表記された時間帯で LPS を処理して、表記された抗体を用いて LSD1 リン酸化依存標的プロモーターでの ChIP 実験を実行した。(E) BMDM で表記された抗体を用いて LSD1 リン酸化依存的な標的プロモーターで ChIP 実験進行。6 時間 Go6976 を先処理した後、細胞収集前に指定された時間 LPS を処理した。データは、平均±標準偏差で表現された; $n=3$ 、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ (Two-way ANOVA) (A、B、D、E)。(F) 過度な LPS が持続的な炎症反応の間核で p65 安定化を促進する時期と方法に対する概略図である。

【図6】核内で p65 の持続的な発現とそれに伴う炎症反応の活性化が PKC α -LSD1-NF κ B シグナル伝達により行われることを示す。(A) 野生型と $Lsd1^{SA/SA}$ マウスの BMDM に表記された時間により LPS を処理して核タンパク質を抽出して指定された抗体を用いて免疫ブロットが行われた。(B) 免疫蛍光分析実験の代表イメージである。免疫蛍光分析実験は、 $Lsd1^{-/-}$ MEF 細胞に HA tag が付いた WT、SA、KA 突然変異形態をトランスフェクションした後、指定された時間 LPS を処理して行われた。HA (緑); p65 (赤); DAPI (青)、スケールバー、20 μ m。(C、D) BMDM (C) と Raw264.7 (D) 細胞の核タンパク質で指定された抗体を用いた免疫ブロット実験が行われた。Go6976 あるいは GSK-LSD1 が 6 時間前処理されて細胞収集前に指定された時間 LPS が処理された。(E) Raw264.7 細胞の核タンパク質で指定された抗体を用いて免疫ブロット実験が行われた。Go6976 と GSK-LSD1 が 6 時間前処理されて LPS を 2 時間追加処理した。この時、細胞収集 4 時間前に MG132 が処理された。

【図7】PKC α や LSD1 の活性をマウスで抑制することが敗血症による死亡率を減少させることを示す。(A) 野生型マウス (各グループ当たり 3 匹) の肺組織で免疫ブロット実験をした。マウスに LPS 腹腔注射 (体重 1 kg 当たり 10 mg 注射、注射後 6 時間以後に実験した) 1 時間前に Go6976 ((CAS136194-77-9)、選別的 PKC 抑制剤、体重 1 kg 当たり 1 mg 注射) あるいは GSK-LSD1 (体重 1 kg 当たり 1 mg 注射) を腹腔で注射した。(B) 野生型 (青線)、 $Lsd1^{SA/SA}$ (赤線) マウスは CLP 手術 (各グループ当たり 20 匹) を受けた。動物の生存率は、CLP 手術以後 144 時間毎 6 時間単位でモニタリングされた。(C、D) CLP 手術後で 12 時間、50 時間にそれぞれ静脈注射により、体重 1 kg 当たり 1 mg の Go6976 を注射 (緑線、それぞれ 20 匹) (C) または GSK-LSD1 を注射 (紫線、それぞれ 20 匹) した。CLP 手術以後 144 時間毎 6 時間単位で生存率がモニタリングされた。 $**p<0.01$ (log-rank test) (B-D) (E) CLP 手術以後肺組織の H&E 代表写真。野生型と $Lsd1^{SA/SA}$ マウス。あるいは野生型マウスに Go6976、GSK-LSD1 又は vehicle を体重 1 kg 当たり 1 mg でそれぞれ手術以後 12 時間、50 時間に静脈注射した (グループ当たり 6 匹ずつ)。マウスは CLP 手術以後 72 時間で安楽死させた。スケールバー、200 μ m。(F、G) CLP 手術以後 72 時間に、血中サイトカイン (MCP-1、IL-6、TNF- α) の濃度。野生型と $Lsd1^{SA/SA}$ マウス (F)、あるいは野生型マウスに Go6976、GSK-LSD1 又は vehicle を体重 1 kg 当たり 1 mg でそれぞれ手術以後 12 時間、50 時間に静脈注射した (G)。(H、I) 敗血症マーカーである ALT、LDH、BUN が CLP 手術以後 72 時間に測定された。野生型と $Lsd1^{SA/SA}$ マウス (H)、あるいは野生型マウスに Go6976、GSK-LSD1 又は vehicle を体重 1 kg 当たり 1 mg でそれぞれ手術以後 12 時間、50 時間に静脈注射した (I)。データは、平均±標準偏差で表現された; $n=5$ 、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ (Two-way ANOVA) (F、H)。データは、平均±標準偏差で表現された; $n=5$ 、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ (unpaired two-tailed Student's t-test) (G、I)。(J) PKC α あるいは LSD1 の活性を防ぐことが p65 のタンパク質安定性を減少させて急性全身炎症に対する抵抗性を誘導して野生型に比べて $Lsd1^{SA/SA}$ マウスで敗血症による生存率を増加させることを示す模

10

20

30

40

50

式図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本願は、過度な炎症刺激に応じた炎症反応の活性化及び増幅において $PKC\alpha \rightarrow LSD1 \rightarrow NF-\kappa B$ につながる新しいシグナル伝達軸が重要であるとの発見に基づいたものである。具体的に $LSD1$ (lysine specific histone demethylase 1) が、炎症反応の重要な後成因子として、過度な炎症性刺激に反応して核に移動した $PKC\alpha$ (Protein Kinase $C\alpha$) によりリン酸化されて $NF-\kappa B$ の p65 を脱メチル化させて安定化を増大させて、炎症反応を活性化することを解明した。 $LSD1$ による脱メチル化が p65 タンパク質を安定化させるようになり $NF-\kappa B$ の活性を持続させて炎症反応が増幅される。従って、一実施例で図5及び6等の実験結果及び図7Jに図示した通り $PKC\alpha$ またはこれによる $LSD1$ の脱メチル化活性を抑制して $NF-\kappa B$ を構成する p65 のタンパク質安定性を減少させると急性全身炎症に対する抵抗性を誘導して生存率を増加させることができる。

10

【0018】

そこで一様態で本願は、本願で解明された、炎症反応誘発で重要な役割をする $PKC\alpha \rightarrow LSD1 \rightarrow NF-\kappa B$ 経路を標的にする炎症反応抑制剤のスクリーニング方法に関するものである。

【0019】

本願に係る方法は、 $PKC\alpha$ 、 $LSD1$ 及び $NF-\kappa B$ を発現する細胞を提供する段階；前記細胞に $NF-\kappa B$ 媒介された炎症反応を誘発することができる刺激を処理する段階で、前記処理によって前記細胞で $PKC\alpha \rightarrow LSD1 \rightarrow NF-\kappa B$ 経路による炎症反応が誘発、触発または始まり、前記細胞に前記経路を抑制、または前記経路による炎症反応を抑制すると期待される試験物質を処理する段階；及び前記処理結果、前記試験物質で処理されなかった対照群と比較して前記試験物質で処理された細胞で前記経路が抑制された場合、または、前記経路による炎症反応が抑制された場合、前記試験物質を炎症反応抑制候補物質として選別する段階を含む。

20

【0020】

プロテインキナーゼCアルファ ($PKC\alpha$) による $LSD1$ の調節は、明暗周期リズム調節で知られていて、 $NF-\kappa B$ は炎症因子として知られているが、炎症反応調節機序で $PKC\alpha \rightarrow LSD1 \rightarrow NF-\kappa B$ 経路は本願で初めて解明されたものである。 $PKC\alpha$ は、 $PKC\alpha$ 、 $PKC\beta 1/\beta 2$ 及び $PKC\gamma$ の活性化剤である $phorbol\ 12-myristate\ 13-acetate$ (PMA) をマウスに処理すると、表皮で炎症性サイトカインの発現が増幅されて同時に急性炎症反応が誘導されることが報告されている (Silvan et al., Inflamm. Res. 1996; 45: 289292)。また PKC シグナリングが炎症反応の活性化に決定的な役割をするが (Langlet et al., Eur. J. Immunol. 2010; 40: 505515)、 PKC の基質と PKC による炎症反応活性化に関連した標的遺伝子に対する分子メカニズムがまだ明確に明らかになっていない。本願では、 $PKC\alpha$ の直接的な基質が $LSD1$ であり $LSD1$ をリン酸化して p65 はリン酸化しないことを解明した (図1等参照)。

30

40

【0021】

リジン特異的脱メチル化酵素1 ($LSD1$ 、AOF2またはBHC110ともいう) は、FAD依存性アミン酸化酵素反応によりヒストン脱メチル化酵素として作用する (Metzger et al., Nature. 2005; 437: 436-439)。その他 $LSD1$ は SET7/9 によってメチル化された非ヒストンタンパク質のリジン基を脱メチル化する。炎症反応で $LSD1$ と $NF-\kappa B$ との関連性については知られていなく、本願では $LSD1$ は後述するように $NF-\kappa B$ を構成する p65 と結合してこれを脱メチル化することを明らかにした。脱メチル化は、p65 を安定化させて、結果 $NF-\kappa B$ 媒介された炎症反応に関与する転写因子の活性を調節して炎症反応を増幅するのを解明した (図4等参照)。

50

【0022】

NF- κ Bは、p65/RelA、p50/NF- κ B1、p52、RelB及びc-Relのサブユニットで構成された炎症因子である (Oeckinghaus and Ghosh, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009; 1:a000034)。これらは、二量体形成に重要なN-末端Rel homology領域、DNA結合領域及びC-末端に核に入ることができる配列を共通で持っている。p65-p50ヘテロダイマー (heterodimer) は最も多く存在して活性が最も高い形態で知られている。刺激されなかった細胞で、I κ Bタンパク質はNF- κ Bサブユニットに結合してこれらを細胞質に隔離させる。炎症性刺激が存在する場合、I κ Bのリン酸化依存性プロテアソーム分解を起こして、NF- κ Bサブユニットは細胞質から核に移動するようになる (Fuchs et al., Oncogene. 1999; 18:2039-2046)。核に移動したNF- κ Bサブユニットは、DNAの κ B elementに結合して、炎症反応に関与する標的遺伝子の発現を活性化させる。例えば、CREB結合タンパク質 (CBP) のようなcoactivatorの動員は標的遺伝子の追加活性化に決定的であると知らされている。持続的なLPS刺激は、NF- κ BによるC/EBP δ の発現を誘導して、誘導されたC/EBP δ は、NF- κ Bと共に作用してサイトカインコーディング遺伝子の転写を追加で刺激してC/EBP δ は炎症反応の増幅役割をするとして知られている。本願に係る一実現例では、LPSで誘発されたPC κ →LSD1→NF- κ B経路でLSD1のリン酸化はゲノム全体水準でNF- κ B標的遺伝子の活性化に必要で (図2参照)、LPS処理によるLSD1リン酸化が標的遺伝子のプロモーターにNF- κ B p65をプロモーターでリクルートするのに必要で (図3参照)、LSD1とp65の結合及びこれによるp65脱メチル化がp65のタンパク質安定化を増大させることを示している (図4参照)。このようなNF- κ B p65のタンパク質安定化は結果的に炎症反応を引き起こす。

10

20

【0023】

本願に係る方法に使用されるPKC α 、LSD1及びNF- κ B (p65) は、遺伝子及びタンパク質配列は公示されたもので、たとえばヒトタンパク質配列はLSD1: NP_001343496. 1、PKC α : NP_035231. 2、NF- κ B (p65): NP_033071. 1と公示なされている。タンパク質配列が知られていると、核酸配列はこれらから容易に導き出されるのは当業者に自明である。

30

【0024】

本願に係る方法では、前記のような機能を持つ限り様々な由来、そして各由来のタンパク質配列及びこれと実質的に同じ配列を持つ全長または断片が使用され得る。実質的に同じとは、タンパク質及び核酸配列水準にともに適用でき、参照または基準となる配列と比較して、塩基またはアミノ酸残基に一つ以上の置換、欠損、または付加があり得るが、全体から見ると機能に差がなかったり、機能を悪くしない水準の機能を持つことを意味する。相同性は、対象になる配列を最大限対応するようにアラインし、当業界に通常利用されるアルゴリズムを利用してアラインされた配列を分析した場合に、最小61%の相同性、より好ましくは70%の相同性、さらに好ましくは80%の相同性、最も好ましくは90%以上、特に95%以上の相同性を示す配列を意味する。配列比較のためのアライメント方法は当業界に公示されている。例えばSmith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482; Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. (1970) 48:443; Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. (1988) 24:307-31; Higgins and Sharp, Gene (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, CABIOS (1989) 5:151-3; Corpet et al., Nuc. Acids Res. (1988) 16:10881-90; Huang et al., Comp. Appl. BioSci. (1992) 8:155-65及びPearson et al., Meth. Mol. Biol. (1994) 24:307-31に開示されている。NCBI Basic Local

40

50

Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403-10) は、NCBIなどで接近可能で、blast、blastp、blastm、blastx、tblastn及びtblastxのような配列分析プログラムと連動されて利用することができる。BLASTはwww.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/で接続可能で、このプログラムを利用した配列相同性比較方法は、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlで確認することができる。

【0025】

一実現例で、PKC α 、LSD1及びNF- κ Bタンパク質はこれを発現する細胞の形態で提供されることができる。例えば、タンパク質を発現 (TransientまたはStable形質移入または内因性発現) する哺乳類細胞、例えばこれで制限しないが、PKC α 、LSD1及びNF- κ Bが発現して、作用できる代表的な細胞ではマクロファージが挙げられる。マクロファージは、動物で採取したものまたは確立された細胞株を使用することができる。特にRaw264.7細胞株またはBMDM (bone marrow-derived macrophage)を使用することができる。一実現例では、Raw264.7細胞株に前記タンパク質を発現するプラスミドを公示された方法または本願の実施例に記載された方法を利用して形質移入して使用することができる。

【0026】

本願に係る前記方法で、刺激存在時PKC α →LSD1→NF- κ B経路が活性化して、PKC α の基質は、LSD1でPKC α はLSD1をリン酸化させて、リン酸化されたLSD1は、NF- κ Bのp65サブユニットを脱メチル化させる。従って、一実現例で本願に係る方法で、PKC α →LSD1→NF- κ Bシグナル伝達経路の抑制は、前記PKC α によるLSD1のリン酸化減少または抑制、及び／または前記NF- κ Bのp65サブユニットの脱メチル化の抑制、及び／またはLSD1とp65の結合抑制または減少で測定されることができる。また、前記シグナル伝達経路の活性化は、炎症反応を誘発するので、前記経路の抑制は、前記経路による炎症反応の抑制であるといえる。このような経路または炎症反応の抑制は、上述したような前記本願で解明された機序を構成するタンパク質を発現する細胞を細胞培養プレートに培養した後、ここに試験物質を添加した後、一定時間後に細胞から、総タンパク質を抽出して、LSD1のリン酸化程度、またはLSD1脱メチル化活性の有無、LSD1とNF- κ B p65の結合及びまたはLSD1によるNF- κ B p65脱メチル化程度で確認することができる。対照群 (試験物質を処理しなかった場合)と比較して、前記LSD1のリン酸化減少、前記NF- κ Bのp65サブユニットの脱メチル化の抑制または前記LSD1と前記p65サブユニットの結合をNF- κ Bシグナルによって媒介される炎症反応候補物質で選別することができる。

【0027】

本願に係る方法で、リン酸化抑制程度は公示された方法を利用して測定でき、例えばタンパク質ブラット方法を利用して確認することができる。タンパク質確認のための使用可能な抗体があつて全長LSD1だけでなくリン酸化されたLSD1を確認する抗体は市販のものを購入することができる。このような抗体を利用してLSD1の全体発現量またはリン酸化されなかったまたはリン酸化されたLSD1の量を特異的に確認することができるが、これに制限しない。対照群 (試験物質を処理しなかった場合)と比較して、LSD1タンパク質のリン酸化程度を抑制したものを敗血症治療剤候補物質として選別することができる。この場合タンパク質は検出の便宜のために様々な標識物質、例えばタンパク質タグ、ビオチン、蛍光物質、アセチル化、放射線同位元素のようなもので公示された方法または市販のタンパク質標識キットを使用して標識することができて、標識された物質に適合した検出機器を使用して検出され得る。

【0028】

本願に係る方法でメチル化または脱メチル化は、公示された方法を利用して行われ、例えばメチル化されたタンパク質を特異的に認識する抗体の使用を含むが、これに制限されず、また本願実施例を参照することができる。

【0029】

本願に係る方法でLSD1と前記p65サブユニットの結合または相互作用は、当業界に公示された様々な方法を利用して測定されることができる。例えば、細胞内タンパク質の結合／相互作用を確認するイーストツーハイブリッド法、コンフォーカル顕微鏡法、共同免疫沈殿法、表面プラズマ共鳴（SPR）及びスペクトロスコピー法を含むが、これに制限されず、このような方法に関する比較及び詳しい実験法に関する追加の参考文献は、Berggard et al., (2007) “Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions”, PROTEOMICS Vol 7: pp 2833-2842に記載されたものを参考にするることができる。

10

【0030】

本願に係る方法は、細胞にNF-κBシグナルによって媒介される炎症反応を誘発する段階を含み、これによって上述した通り本願に解明されたPCKα、LSD1及びNF-κBで構成される経路が活性化される。

【0031】

一実現例で細胞にNF-κBシグナルによって媒介される炎症反応を誘発することができる様々な刺激が本願に使用され、例えば前記NF-κB媒介された炎症反応を誘発することができる刺激は、TNFα (tumor necrosis factor)、IL-1β (interleukin 1-beta)、PAMP (pathogen-associated molecular pattern) またはバクテリアLPS (lipopolysaccharides) を含む (Courtois G、Gilmore TD (2006) Mutations in the NF-κappaB signaling pathway: implications for human disease. Oncogene. 2006 Oct 30; 25 (51): 6831-43; Gutierrez H、Davies AM (2011) Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-κB. Trends Neurosci. 2011 Jun; 34 (6): 316-25.)。

20

【0032】

本願で炎症または炎症反応とは、病原菌、刺激物質、または損傷された細胞などのような組織に危害な刺激に対する組織の複合的な生物学的反応で、免疫細胞、血管及び分子媒介子を含む保護的な反応である。炎症反応は、細胞損傷を引き起こす初期原因を除去して、損傷した細胞または組織を除去して組織復旧を開始するものである。炎症反応は、熱、痛み、発赤及び腫れなどの症状を伴う。

30

【0033】

本願でNF-κBシグナルによって媒介される炎症反応とは、先述した免疫シグナル刺激によってNF-κBタンパク質が活性化する場合を意味する。本願では、特にNF-κBを活性化させる経路の中で、特にLSD1によるp65サブユニットの脱メチル化による経路である。炎症反応が活性化すると、分子水準でサイトカインの発現、たとえばIL-1β、IL-6、MCP-1、TNF-αなどの発現が増加して、これを検出して炎症反応が活性化を決めることができる。

40

【0034】

本願に係る方法で細胞は、PCKα→LSD1→NF-κB経路を抑制すると期待される試験物質で処理される。

【0035】

前記経路の抑制は、前記LSD1のリン酸化減少及び／または前記NF-κBのp65サブユニットの脱メチル化及び／またはLSD1とp65の結合減少または抑制と測定されることができる。このような減少または抑制は、試験物質で処理されなかった対照群と比較して抑制または減少を意味して、当業者なら本願に開示された内容及び／または当業界の常識を根拠に抑制または減少した程度を簡単に決めることができる。抑制または減少

50

を決めるに当たり、炎症反応の活性化と共に増加するサイトカインの発現量の変化をも測定することができる。

【0036】

本願で調節 (modulation) とは、特定生物学的機能の活性化、刺激または上向き調節、または低下または下向き調節、または両方を含み、イン・ビトロ状態での調節、イン・ビボ状態での調節、エクス・ビボ状態での調節をいずれも含むものである。一実現例で調節は、炎症反応の抑制である。

【0037】

本願の方法に使用される試験物質は、 $PKC\alpha \rightarrow LSD1 \rightarrow NF-\kappa B$ 経路シグナル伝達システムに作用して、 $LSD1$ のリン酸化を減少させて、 $NF-\kappa B$ の p65 サブユニットの脱メチル化を調節特に抑制すると期待される物質で、低分子量化合物、高分子量化合物、化合物の混合物（例えば、天然抽出物または細胞または組織培養物）、またはバイオ医薬物（例えば、タンパク質、抗体、ペプチド、DNA、RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi、アプタマー、RNase 及び DNase）または糖及び脂質などを含むがこれに限定しない。

【0038】

本願に係る一実現例では、低分子化合物が試験物質として使用される。前記試験物質は、合成または天然化合物のライブラリーから得ることができ、このような化合物のライブラリーを得る方法は当業界に公示されている。合成化合物ライブラリーは、Maybridge Chemical Co. (UK)、Comgenex (USA)、Brand 20
on Associates (USA)、Microsource (USA) 及び Sigma-Aldrich (USA) から購入可能であり、天然化合物のライブラリーは、Pan Laboratories (USA) 及び MycoSearch (USA) から購入可能である。試験物質は、当業界に公示された様々な組合ライブラリー方法によって得ることができて、例えば、生物学的ライブラリー、空間アドレスラブルパラレル固相または液相ライブラリー (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries) 、デコンボリューションが求められる合成ライブラリー方法、“1-ビズ1-化合物”ライブラリー方法、そして親和性クロマトグラフィー選別を利用する合成ライブラリー方法 30
によって得ることができる。分子ライブラリーの合成方法は、DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 等に開示されている。例えば、薬物のスクリーニング 40
目的のためには化合物は低分子量の治療効果を持つものが使用されることができる。例えば、重量が 400 Da、600 Da または 800 Da のような約 1000 Da 内外の化合物が使用されることができる。目的に応じてこのような化合物は化合物ライブラリーの一部を構成することができ、ライブラリーを構成する化合物の数も数十個から数百万個まで多様である。このような化合物ライブラリーは、ペプチド、ペプチド及びその他環状または線状のオリゴマー性化合物、及び鋳型を基本とする低分子化合物、例えばベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピアリール、カーボサイクル及びポリサイクル化合物（例えばナフタレン、フェノチアジン、アクリジン、ステロイドなど）、カーボハイドレート及びアミノ酸誘導体、ジハイドロピリジン、ベンズヒドリル及びヘテロサイクル（例えばトリアジン、インドール、チアゾリジンなど）を含むこともできるが、これは単に例示的なものであり、これに限定されない。

【0039】

10

20

30

40

50

また、たとえばバイオリジックスがスクリーニングに使用されることができる。バイオリジックスとは、細胞またはバイオ分子を称するもので、バイオ分子とは、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質または生体内及び生体外で細胞システムなどを利用して産生された物質を称する。バイオ分子を単独でまたは他のバイオ分子または細胞と組み合わせて提供されることができる。バイオ分子は、たとえば、ポリヌクレオチド、ペプチド、抗体、またはその他血しょうで発見されるタンパク質または生物学的有機物質を含むものである。

【0040】

実験結果、試験物質と接触しなかった対照群と比較して試験物質の存在下でLSD1のリン酸化及び／またはNF-κBのp65サブユニットの脱メチル化及び／またはLSD1とp65の結合を抑制すると期待される物質を候補物質として選別する。対照群と比較して約10%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、または約100%以上、または、これ以上を増加または減少したものを候補物質として選別することができる。

10

【0041】

本願に用いられるタンパク質は、当業界に公示された方法を使用して製造されることができる。特に遺伝子組換え技術を利用する。例えば、前記タンパク質をコーディングする相応する遺伝子を含むプラスミドを原核細胞または真核細胞、たとえば昆虫細胞、哺乳類細胞に伝達して過発現させた後精製して使用することができる。前記プラスミドは、たとえば本願の例示的実現例で使用したような動物細胞株にトランスファクションした後、発現したタンパク質を精製して使用することができるが、これに制限しない。この場合、タンパク質は検出の便宜のために様々な標識物質、例えばビオチン、蛍光物質、アセチル化、放射線同位元素のようなもので公示された方法または市販のタンパク質標識キットを使用して標識することができて、標識された物質に適合した検出機器を使用して検出されることができる。

20

【0042】

または、スクリーニングタンパク質を暗号化するDNAまたはRNA配列を適当な宿主細胞で発現させてその細胞破砕物を作ったり前記スクリーニングタンパク質のmRNAを試験管内で翻訳後当業界に公示されたタンパク質分離方法によってスクリーニングタンパク質を精製することができる。通常、細胞残屑 (cell debris) 等を除去するために、前記細胞破砕物または試験管内翻訳した結果を遠心分離した後、沈殿、透析、各種カラムクロマトグラフィーなどを適用する。イオン交換クロマトグラフィー、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー、HPLC、逆相-HPLC、プレプ用SDS-PAGE、親和性カラムなどはカラムクロマトグラフィーの例である。親和性カラムは、例えば、抗スクリーニングタンパク質抗体を利用して作ることができる。

30

【0043】

その他前記方法に使用される試験物質の種類などは先述したものを参照することができる。

【0044】

本願に係る方法によって選別された炎症反応調節、特に抑制物質は炎症疾患の治療剤として使用されることができる。

40

【0045】

本願で炎症性疾患は、炎症または炎症反応による様々な症状または疾患を含み、例えば敗血症、アレルギー、喘息、自己免疫疾患、肝炎、糸球体腎炎、肝炎、炎症性腸疾患、再灌流障害及び移植拒否などのような種々の症状または疾患を含む。

【0046】

本願では特にNF-κBを媒介とする炎症反応による疾患は、これに制限しないが、敗血症、リウマチ関節炎または自己免疫疾患を含む。

【0047】

本願に係る一実現例では、本願に係る方法は、特に敗血症治療剤物質のスクリーニングに使用される。また、他の実現例で本願に係る方法によってスクリーニングされた物質は

50

、敗血症治療剤として有用である。本願で使われた用語“敗血症”とは、Enterococcus spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp, Enterobacteriaceae family, Providencia spp. 及びPseudomonas spp. などのようなバクテリアまたは寄生虫感染による全身炎症反応で、心拍動増加、低血圧、低または高体温症、はやい呼吸及び白血球数の増加または減少のような症状を示す疾患を称する。特に本願に係る一実施例でLsd1^{SA/SA}マウスは敗血症を模倣する条件下でWTマウスに比べて低い炎症性サイトカインの産生と共に、さらに高い生存率を示した。このようなデータによりPKC α -LSD1シグナル伝達をターゲティングすることが、敗血症のような炎症性疾患に強力な治療戦略になれることを証明した。

10

【0048】

本願で使われた用語“治療”とは、疾患、または疾患による症状または状態の抑制、除去、軽減、緩和、改善、及び／または予防を含む概念である。

【0049】

以下、本発明の理解を助けるために実施例を提示する。しかし、下記実施例は本発明をより理解しやすくするために提供されるだけで、本発明が下記実施例に限定されるのではない。

【実施例】

【0050】

実験方法及び材料

20

細胞培養：Raw264.7 (KCLB)、L929、MEFs細胞は。ZelShield (Minerva Biolabs GmbH) 1%、10% FBSが添加されたDulbecco's modified Eagle's培地 (DMEM, Welgene) で培養された。マイコプラズマがない条件を保障するために、日常的にすべての細胞のマイコプラズマ検査を行った。

【0051】

BMDM製作：マウスはCO₂過吸入により安楽死させて、マウスから大腿骨と脛骨を取得した。70%エタノールと冷たいPBSで洗浄した後に、骨髓を大腿骨と脛骨から分離した。骨髓細胞は、RPMI-1640培地 (Welgene、1% ZelShield、10% FBS添加) に1X10⁶~2X10⁶/ml濃度で培養された。その後Macrophage colony stimulating factor (10ng/ml, sigma) と10% L929-conditioned培地を細胞に添加されし7~8日間分化された。

30

【0052】

抗体及び試薬：Santa Cruz Biotechnology製品：p65抗体 (sc-372、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用、免疫蛍光分析のために1:200で希釈して使用)、LaminA/C抗体 (sc-6215、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用)、GFP抗体 (sc-9996、免疫プロットのために1:5000で希釈して使用)、GST抗体 (sc-459、免疫プロットのために1:5000で希釈して使用)；Cell Signaling製品：LSD1抗体 (#2139、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用)、PKC α 抗体 (#2056、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用)；Abcam製品：p65抗体 (ab7970)、LSD1抗体 (ab17721)、H3K9Ac抗体 (ab4441)、H3K9me2抗体 (ab1220)、H3K4me2抗体 (ab32356)；Novus製品：LSD1抗体 (NB-100-1762)、PKC α 抗体 (NB-110-57356、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用)、C/EBP δ 抗体 (NB-110-85519、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用)；Millipore製品：p-PKC α S657抗体 (#06-822、免疫プロットのために1:1000で希釈して使用) p-LSD1抗体 (ABE1462、免疫プロットのために1:200で希釈して使用)；Sigma製品： β -actin抗体 (A

40

50

1978、免疫ブロットをために1:5000で希釈して使用)、Flag抗体(F3165、免疫ブロットをために1:5000で希釈して使用)、Lipopolysaccharides (LPS) from *E. coli* O127:B8 (L3129)、GSK-LSD1 (SML1072); そのほか他社製品: HA抗体(MMS-101R、免疫ブロットをために1:5000で希釈して使用、免疫蛍光分析のために1:200で希釈して使用、Covance製品)、Tubulin抗体(LF-PA0146A、免疫ブロットをために1:1000で希釈して使用、Abfrontier製品)、monomethyl-p65 (K314/315) 抗体(ENH006、免疫ブロットをために1:500で希釈して使用、Elabscience Biotechnology製品) FK2抗体(BML-PW8810、免疫ブロットをために1:1000で希釈して使用、Enzo Life Sciences製品)、Go6976 (13310、Cayman製品)、MG132 (M-1157、A. G. Scientific製品)、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (L1170、Promega製品)、λ-phosphatase (P0753、NEB製品)。

10

【0053】

動物飼育: C57BL/6J backgroundのLsd1^{SA/SA}マウスを作る方法はすでに記述されている(Nam et al., Mol. Cell. 2014; 53:791-805)。8-10週齢の野生型及びLsd1^{SA/SA}マウスを実験に使用した。マウスは22-23℃室内温度と光条件(12時間明:12時間暗、明かりは朝8時につく)で維持された。餌物と水は自由に摂取できるよう供給した。すべての動物実験はソウル大学動物実験及び利用委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)の承認を受けた。

20

【0054】

LPS処理: 細胞を24時間FBSがない状態で育てた以後、LPS(1μg/mlあるいは表記された濃度)を表記された時間だけ処理した。細胞は、免疫ブロットあるいはquantitative RT-PCRあるいはChIP実験に使用するにそれぞれの実験方法に従って収集されて溶解した。

【0055】

定量RT-PCR: 全RNAは、肺組織、BMDM、あるいはRaw264.7細胞からTRIzol(Invitrogen製品)を利用して分離した。RNAは、oligo dTプライマーとM-MLV Reverse Transcriptase(Enzymomics製品)を使用して逆転写された。得られたcDNAは、TOPrealTM qPCR 2X Premix(SYBR Green with high ROX、Enzymomics製品)と遺伝子特異プライマーでPCRをした。mRNA量は、ABI-7500で検出した。プライマー情報は以下のとおりである。

30

mouse Mcp-1 Forward 5'-GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC-3'、
 mouse Mcp-1 Reverse 5'-AGCCTACTCATTTGGGATCATCTTG-3'、
 mouse Il-6 Forward 5'-CATAAAATAGTCCTTCTACCCCAAT-3'、
 mouse Il-6 Reverse 5'-CACTCCTTCTGTGACTCCAGCTTA-3'、
 mouse Il-1b Forward 5'-GATGATAACCTGCTGGTGTGTGA-3'、
 mouse Il-1b Reverse 5'-GTTGTTTCATCTCGGAGCCTGTAG-3'、
 mouse Cebpd Forward 5'-CTCCACGACTCCTGCCATGT-3'、
 mouse Cebpd Reverse 5'-GAAGAGGTCGGCGAAGAGTTC-3'、
 mouse RelA Forward 5'-TGTGGAGATCATCGAACAGCCG-3'、
 mouse RelA Reverse 5'-TTCCTGGTCCTGTGTAGCCATTGAT-3'。

40

RNA-seq分析: RNA-seqライブラリーは、生産者の指針に従ってTruSeq RNA Sample prep kit v2(Illumina)を使用して製作した。RNA-seqライブラリーは、Illumina Hi-seq 3000/4000 SBS kit v3(MACROGEN Inc.)でpair-end

50

sequencingされた。すべてのRNA-seqデータは、Tophatパッケージ (Kim et al., Genome Biol. 2013; 14: R36) を使用してマウスゲノム (mm9) でマッピングされた。Differential分析は、 1×10^{-4} のFDR (false discovery rate) カットオフ (Kim et al., Genome Biol. 2013; 14: R36; Robinson et al., Bioinformatics. 2010; 26: 139-140) を使用してEdgeRパッケージを介して行われた。DEGの遺伝子発現値を使用して階層的クラスタリング分析を行った。特に距離測定値で1- (相関係数) がある遺伝子に対するWardの基準を用いた。クラスタヒットマップは、各遺伝子に対するサンプルでz点数を使用して描いた。ChIP-seqデータは、Bowtieを用いてマウスゲノムにマッピングされた。p65に対するピークは一致する入力値対照群を使用してHomerのfindPeaks命令で行われた。それぞれDEGで、TSSの10kbp以内に位置したp65ピークを調べた。De novo p65ピークはHomerでfindMotifsGenome命令を使用して行われた。nascent transcriptの量を得るためにマクロファージでLPS処理前後のグローバルラン-オンシーケンシング (GRO-seq) を用いた。GRO-seq fastqファイルは、poly Aとアダプタシーケンスを捨てるためにtrim_galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) を利用してトリミングされた (Hah et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015; 112: E297-E302) 。トリミングされたread値は-best-v2-m1オプションを用いてbowtie (v1.0.0) とマッピングされた。bowtieファイルにはHOMERのmakeTagDirectory機能でタギングされた。平均プロファイルはマッピングされたread値を 1×10^{-7} で正規化した後に得られた。

【0056】

ChIP実験：細胞を1%ホルムアルデヒドで10分間cross-linkと冷たいPBSで二回洗浄した。細胞を1mlのharvest buffer (0.1M Tris-HCl [pH9.4]、実験前に10mM DTT追加) を入れてスクレーパーで掻いて1.5mlチューブに入れて30℃で15分間置いた後、6000rpmに3分間遠心分離した。細胞のペレットを冷たいPBSで洗浄した後、buffer I (0.25% Triton X-100、10mM EDTA、10mM HEPES [pH6.5]、及び0.5mM EGTA) とbuffer II (200mM NaCl、1mM EDTA、10mM HEPES [pH6.5]、及び0.5mM EGTA) を順に入れて洗浄した。ChIP lysis buffer (50mM Tris-HCl [pH8.1]、1% SDS、10mM EDTA [pH7.6]、実験前にprotease inhibitor cocktail追加) を入れてソニケーションによりクロマチン切片を作る。平均の長さ250bpのDNA断片で作られたクロマチン抽出物をdilution buffer (1% Triton X-100、2mM EDTA、150mM NaCl、20mM Tris-HCl [pH8.1]、実験前にprotease inhibitor cocktail追加) で希釈して抗体を入れて4℃で一晩中免疫沈殿させた。翌日protein A/G sepharoseビーズを40ulずついれて2時間4℃でローテーションをさせた。ビーズはTSE I buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、2mM EDTA、20mM Tris-HCl [pH8.1]、及び150mM NaCl)、TSE II buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、2mM EDTA、20mM Tris-HCl [pH8.1]、及び500mM NaCl)、buffer III (0.25M LiCl、1% NP-40、1% deoxycholate、10mM Tris-HCl [pH8.1] 及び1mM EDTA)、三回のTE buffer (10mM Tris-HCl [pH8.0]、及び1mM EDTA) 順で洗浄された。尚、elution buffer (1% SDS、0.1M NaHC

10

20

30

40

50

O₃) を使用してビーズで湧出させた。湧出された抽出物を 65℃で一晩置いて reverse cross-linking をさせて DNA は QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用して精製された。精製された DNA は、quantitative RT-PCR により分析された。合計 50 μl の DNA 中 2 μl が PCR に使用された。PCR プライマーのシーケンス情報は下記のとおりである。

mouse Mcp-1 Forward 5'-CACCCCATTACATCTCTTCCCC-3'、
 mouse Mcp-1 Reverse 5'-TGTTTCCTCTCACTTCACTCTGTC-3'、
 mouse Il-6 Forward 5'-AGCTACAGACATCCCCAGTCTC-3'、
 mouse Il-6 Reverse 5'-TGTGTGTCGTCTGTCATGCG-3'.

10

ChIP-seq 分析: ChIP-seq ライブラリーは、生産者の指示事項に従って KAPA library preparation kit を使用して準備した。ChIP-seq ライブラリーは、Illumina Hi-seq 4000 SBS kit v3 (MACROGEN Inc.) でシングルエンドシーケンシングされた。ChIP-seq read は、Bowtie (Langmead et al., Genome Biol. 2009; 10: R25) を使用してマウス reference genome (NCBI build 37, mm9) に align された。unique peak だけ HOMER によって peak 呼び出しと注釈付けが使用された (Heinz et al., Mol. Cell. 2010; 38: 576-589)。LPS 処理後、LSD1 と重なる p65 ピークが考慮された。BedGraph ファイルは、カリフォルニア大学の Santa Cruz Genome Browser で生成及び照会された。ChIP-seq に p65 (SC-372) と LSD1 (ab1772) 抗体を用いた。

20

【0057】

組織 lysate の準備: 肺組織は、血を除去するために、homogenize する前に冷たい PBS で洗浄した。肺は、RIPA バッファー (150mM NaCl、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50mM Tris-HCl [pH7.5]、及び 2mM EDTA [pH8.0]、実験前 protease inhibitor cocktail 追加) で homogenize されて、以後 4℃、14,000g で遠心分離して、きれいな上層液を免疫ブロット実験に使用した。

30

【0058】

全細胞 lysate と細胞内分画化 (fractionation): すべての細胞は冷たい PBS で洗浄した。全細胞 lysate を作るために protease inhibitor を入れた RIPA バッファーに再懸濁して、Branson Sonifier 450 を使用して output 3、duty cycle は 30、5 pulses でソニケーションした。細胞質と核の分離のために、細胞は Buffer A (10mM HEPES [pH7.9]、10mM KCl、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA、実験前 DTT、PMSF、protease inhibitors 追加) で溶解して氷に 15 分間置いて以後 0.5% NP-40 を追加して、120g 4℃で 1 分間遠心分離した。上層液 (細胞質の部分) は新しいチューブに移された。核の部分であるペレットは、120g 4℃で 1 分間遠心分離した。上層液は捨ててペレットは buffer C (20mM HEPES [pH7.9]、400mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、実験前 DTT、PMSF、protease inhibitors 追加) で再溶解した後全細胞 lysate のようにソニケーションした。すべての lysate を Bradford で定量だったし、SDS-PAGE により分析した。

40

【0059】

In vitro キナーゼ実験: HEK293T 細胞 lysate で PKCα を免疫沈降してキナーゼ実験を準備して、基質である GST-LSD1、GST-p65 は E. coli. で精製した。PKCα、GST-LSD1、GST-p65 は kinase a

50

ssay buffer (40mM Tris-HCl [pH7.5]、10mM MgCl₂、1mM DTT、及び5μCi of [γ -³²P] ATP) に30℃30分間反応した。反応物に5X sample bufferを追加して10分間沸かした。サンプルでSDS-PAGE実験を進めて、リン酸化はautoradiographyにより検出された。

【0060】

In vitro GST pull-down実験：GST融合constructはRosetta E. coliバクテリア (Novagen) で発現された。GST binding buffer (125mM NaCl、20mM Tris-HCl [pH7.8]、10% Glycerol、0.1% NP-40、0.5mM DTT 実験前protease inhibitors追加) でソニケーションしてcrude extractを準備して、13000rpmで30分間溶解物を遠心分離した。上層液だけ分離してglutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) を100ul入れて4℃で一晩中ローテーションした。p65タンパク質は生産者の指示とおり、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega、L1170) のcold methionineを使用して製作した。cold ATPを使用したin vitroキナーゼ実験が、GST pull-down実験前にリン酸化されたGST-LSD1を作るために行われた。リン酸化されたLSD1を同量ずつ二つのチューブに分けて、二つ中一方のチューブに1000unitのλ-phosphatase (NEB、P0753) を処理して30℃30分間反応した。ビーズに結合したGST融合タンパク質はバッファー (150mM NaCl、25mM Tris-HCl [pH8.0]、10% Glycerol、0.1% NP-40、and 1mM EDTA) で洗浄してin vitroで合成されたp65タンパク質と混ぜてGST binding bufferで1時間4℃でローテーションした。ビーズはGST binding bufferで7回洗浄して、サンプルバッファーを入れて10分間沸かした後SDS-PAGEと免疫ブロットで分析した。

【0061】

In vitroメチル化脱メチル化実験：In vitroメチル化実験方法は、以前に報告されている (Kim et al., Nat. Commun. 2016; 7:10347)。Flag-p65はFlag M2 agaroseビーズ (Sigma、A2220) を使用してFlag-tag付きp65を発現するHEK293T抽出物で精製した。4℃で一晩中インキュベーションした後に、ビーズに結合したタンパク質を除去するためにBC500 buffer (20mM Tris-HCl [pH7.9]、15% glycerol、1mM EDTA、1mM dithiothreitol、0.2mM PMSF、0.05% Nonidet P40、及び500mM KCl) で洗浄された。きれいに洗浄した後に、ビーズはmethylation assay buffer (50mM Tris-HCl [pH8.5]、20mM KCl、10mM MgCl₂、10mM β-mercaptoethanol、及び250mM sucrose) で3回洗浄した。In vitroメチル化実験は、ビーズに結合したflag-p65、ビーズから分離したGST-SET7/9タンパク質 (L-Glutathione reducedで分離した、Sigma G4251)、SAM (Sigma、A7007) をmethylation assay bufferに入れて30℃で一晩中行われた。In vitro脱メチル化実験をする前にビーズに結合されたflag-p65に結合したSET7/9タンパク質を完璧に除去するためにwash buffer (50mM NaH₂PO₄ [pH8.0]、10mM Tris-HCl [pH8.0]、500mM NaCl、及び0.5% TritonX-100) できれいに洗浄して、demethylation buffer (50mM Tris-HCl [pH8.5]、50mM KCl、5mM MgCl₂、5% glycerol、及び0.5mM PMSF) に変えた後、LSD1タンパク質あるいはリン酸化され

10

20

30

40

50

たLSD1タンパク質を追加した。37℃で一晩中反応した後に2X sample bufferを入れて10分間沸かしてSDS-PAGEを行った後、免疫ブロットで分析した。

【0062】

ユビキチン化実験：細胞にHismax-ユビキチンと共にDNAプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションしてから48時間後にMG132 (5 µg/ml)を4時間処理した。その後buffer A (6M guanidium-HCl、0.1M Na₂HPO₄/NH₂PO₄、0.01M Tris-HCl [pH8.0]、5mMイミダゾール及び10mM β-mercaptoethanol)で細胞を破碎して、Ni²⁺-NTAビーズ (QIAGEN)と共に常温で4時間インキュベーションさせた。ビーズをbuffer A、buffer B (8M urea、0.1M Na₂PO₄/NaH₂PO₄、0.01M Tris-Cl [pH8.0]、及び10mM β-mercaptoethanol)、buffer C (8M urea、0.1M Na₂PO₄/NaH₂PO₄、0.01M Tris-Cl [pH6.3]、及び10mM β-mercaptoethanol)順に洗浄した後ビーズに付いているタンパク質をbuffer D (200mM imidazole、0.15M Tris-Cl [pH6.7]、30% glycerol、0.72M β-mercaptoethanol、及び5% SDS)で抽出した。そして免疫ブロットで分析した。

10

【0063】

Endogenousユビキチン化分析のためのdenatured免疫沈殿：Raw 264.7細胞をdenaturing buffer (50mM Tris-HCl [pH7.5]、70mM β-Mercaptoethanol、及び1% SDS)に破碎して95℃5分間沸かした。non-denaturing lysis buffer (20mM Tris-HCl [pH7.5]、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、及び1% Triton X-100)で希釈した後p65抗体を用いて免疫沈殿させた。サンプルは、FK2抗体を用いた免疫ブロットで分析された。

20

【0064】

免疫蛍光分析法：Lsd1-/-MEFsを1%ゼラチンがコーティングされたカバースリップで育てた。免疫蛍光実験のために細胞をPBSで二回洗浄して、2%ホルムアルデヒドで30分間固定させた。そして細胞を0.1% triton-X100が溶けられているPBSで二回洗浄した。抗体の浸透のために細胞を0.5% triton-X100溶けられているPBSに5分間インキュベーションさせた後、抗体の非特異的な結合を防ぐためにblocking buffer (5% BSA in 0.1% PBS-T)でブロッキングさせた。一次抗体 (HA、MMS-101R Covance製品、blocking bufferで1:200に希薄；anti-p65、sc-372 from Santa Cruz製品、blocking bufferで1:200に希薄)をブロッキング溶液に入れて細胞とインキュベーションさせた。以後、0.1% PBS-T溶液で8回洗浄した後二次抗体 (Invitrogen、molecular probes、blocking bufferで1:200に希薄)と共に1時間インキュベーションさせた。以後再び0.1% PBS-T溶液で8回洗浄した後、ベクターシールド (vectashield) (H-1000)でマウンティングし、コンフォーカル顕微鏡 (Carl Zeiss、LSM700)で写真を得た。

30

40

【0065】

敗血症誘導：盲腸を縛って穿孔を行う手術 (Cecal ligation and puncture、以下CLP)のために、雄マウスを小げっ歯類ガス麻酔機械 (RC2、Vetequip、Pleasanton)を介して酸素の供給と共に、2% isoflurane (Forane、JW pharmaceutical)で麻酔させた。まず呼吸チャンバーで、そして顔面マスクを介して麻酔させたので、手術途中自然に呼吸

50

ができるようにした。CLP誘発性敗血症は、以前に記述された通り実行された (Wang et al., Nat. Med. 2004; 10: 1216-1221)。簡単に説明すると、盲腸と隣接した腸の露出のために、2 cm中間線切開を配置した。次に盲腸を3.0ーシルク縫合糸を使用して盲腸の端から5.00 mmに強く縛って22ゲージの針を使用して穴をあけた。次に盲腸を柔らかく絞って穿孔部位から少量の便を外に流出させて腹腔の元の位置に戻した。開腹手術部位を4.0ーシルク縫合糸で縫合した。

【0066】

Hematoxylin and eosin (H&E) 染色：マウス肺の組織学的変化を分析するために、肺サンプルをそれぞれのマウスで摘出し、血を除去するために3回PBSに洗浄して4%ホルムアルデヒド溶液 (Junsei) で4℃20時間固定した。固定を終えた後、サンプルをエタノールシリーズで脱水させて、パラフィンを入蔵させた。4 μm厚さで切片を作ってスライドに載せた。スライドを60℃オーブンで脱パラフィン化して再水和した以後、hematoxylin (Sigma) で染色した。過度な染色を除去するためにスライドを酸性アルコールに3回早く漬け、eosin (Sigma) で対照染色した。その後エタノールシリーズで洗浄してxyleneに漬けた後マウンティングした。肺組織の肺構造、組織浮腫及び炎症細胞の浸潤を評価するために顕微鏡でブラインド分析した。

【0067】

敗血症マウス血しょうの臨床化学及びサイトカイン分泌水準測定：新鮮な血清を使用してalanine transaminase (ALT)、血液尿素窒素 (BUN)、及びLDHをbiochemical kits (Mybiosource) で測定した。IL-6、MCP-1、及びTNF-αの濃度を確認するために、ELISA kit (R&D Systems) を生産者の指示に従って使用した。値はELISAプレートリーダー (Tecan, GmbH) を使用して測定した。

【0068】

統計分析：GraphPad Prism softwareを利用して、グループの差を見るためにStudent t-testとlog rank testを、そしてグループ差と条件差を共に見るためにtwo-way ANOVAを行ってデータを分析した。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【0069】

実施例1 PKCαによるLSD1のリン酸化の生体内炎症反応の重要性分析

生体内炎症反応にLSD1のリン酸化が重要であるか否かを確認するために、Lsd1^{SA/SA}マウスでLPSによって誘発される炎症反応がきちんと起きるか否かを確認した。野生型 (WT) 及びLsd1^{SA/SA}マウスを用いて、LPS誘発炎症及び急性肺損傷マウスモデルで分析した。組織病理学的検査でLPSが注射されたWTマウスは激しい肺損傷及び肺胞損傷を示すがLsd1^{SA/SA}マウス (図1A) では反応が顕著に弱くなっていることを確認した。WTマウスの場合、LPS投与66時間以内に80%が死亡したが、同じ期間内にLsd1^{SA/SA}マウスは30%だけ死亡した (図1B)。本発明者はLsd1^{SA/SA}マウスがLPSで誘発された炎症反応、急性肺損傷が起き難く、それに伴って死亡率が低いことを発見した。WTマウスで得た骨髓由来マクロファージ (以下、BMDM) でLPSを処理すると、PKCαとLSD1のリン酸化が誘導される一方、Lsd1^{SA/SA}マウスで得たBMDMではPKCαのリン酸化は誘導されるがLSD1のリン酸化は起きないことを確認した (図1C)。BMDMだけでなく、LPS誘発LSD1のリン酸化は、WTマウスの肺組織lysateでも検出された。マウスにGo6976を事前注入してLPSを注射した時には、LSD1のリン酸化が完全に遮断されることも確認した (図1D)。

【0070】

LPSがLSD1のリン酸化を誘導する方法を確認するために、BMDM細胞を細胞質と核に分画化して免疫ブロット実験を進めた。LPS処理がPKCαの活性形態であるPKCαのリン酸化を誘導してリン酸化されたPKCαが核中に入ったことを発見した (図

10

20

30

40

50

1 E)。またLPSで誘導されたPKC α の核への移動が、LSD1とPKC α の核内結合を誘発した(図1F)。いつリン酸化が起きるのか確認しようと時間帯別にLPSを処理して、LPS処理後60分からLSD1のリン酸化と共にPKC α のリン酸化が増大するのをBMDMで観察した(図1G)。PKC α とLSD1のリン酸化は高濃度(>100 ng/ml)のLPSを処理した際に誘発されることも確認した(図1H)。LSD1のリン酸と関連した炎症反応の分子メカニズムを確認するために、以後高濃度のLPSで実験を進めた。in vivoマウス実験を介して、Lsd1^{SA/SA}マウスがLPSによる炎症反応、急性肺損傷が誘発され難くさらに死亡率が低いのを確認した。高容量のLPS(>100 ng/ml)を60分以上処理した時にだけリン酸化されたPKC α が核に移動してLSD1のリン酸化を誘導することもマクロファージで確認した。

10

【0071】

実施例2 LPS誘発LSD1のリン酸化はゲノム全体水準でNF- κ B標的遺伝子の活性化への必要性分析

LPSが誘発する転写モジュールが炎症反応のシグナル開始と増幅のために精巧に調節されるので(Medzhitov and Horng, 2009)、炎症反応の転写調節でLSD1リン酸化に依存的な遺伝子セットが何かを確認しようとした。WTとLsd1^{SA/SA}マウスで抽出したBMDMにLPSを処理した後RNAシーケンシングを行った(図2A)。LPS処理時、WTとLsd1^{SA/SA}BMDMの全体転写量を比較して、監督しなかった階層的クラスタ分析(実験方法参照)により合計3,558個の異なるように発現する遺伝子(以下、DEG)を確認した。この遺伝子中、WT BMDMでLPSと処理時活性化するがLsd1^{SA/SA}BMDMでは活性化しない遺伝子プール(図2Bのcluster1)に特に関心を寄せた。リン酸化されたLSD1が転写のcoactivatorとして作用すると考えたためである。他のクラスタの遺伝子とは異なりクラスタ1の遺伝子は転写開始部位(以下、TSS)周囲のp65ピーク(hypergeometric p-value<1e-130)が有意に多く見られた。これは、p65がLPS処理時クラスタ1に存在する遺伝子の発現を誘発する主要転写因子(以下、TF)であることを意味する(図2B)。Enrichr(<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)を利用したGene ontology(GO)分析を介してクラスタ1にサイトカイン生成及び炎症反応に関連した遺伝子が多く存在するのを確認した(図2C)。さらに、De novoモチーフ分析を介してp65がクラスタ1遺伝子の主なTFであることを再確認した(図2D)。RNA-seqデータの結果を定量的RT-PCR分析を介して再度確認した(例:クラスタ1のMcp-1、Il-6、Il-1 β 及びCebpd)(図2E)。さらに、マウスの肺組織で抽出したmRNAを利用してクラスタ1でLSD1リン酸化依存性遺伝子のmRNAレベルを確認してみた結果、対照群であるWTマウスと比較してLsd1^{SA/SA}で有意に低いことをマウス個体水準で確認した。一貫して、WTマウスにGo6976を事前注入すると、肺組織mRNAでLSD1リン酸化依存性遺伝子の発現が対照群に比べて低いのが確認された(図2G)。このデータは、LPSで誘発されたLSD1のリン酸化がp65と関連したNF- κ B標的遺伝子の活性化に必であることを示す。

20

30

【0072】

実施例3 LPSで誘導されたLSD1リン酸化はNF- κ Bのp65を標的プロモーターへのリクルートに重要であることを分析

p65がリン酸化されたLSD1によって調節される主要TF(転写因子)と確認されたので、LSD1がLPSに反応してp65と結合するか否かを調べた。LPS処理時LSD1が核でp65と結合するのをBMDM細胞で確認した(図3A)。LSD1がLPSに反応してリン酸化されたので、リン酸化されたLSD1がp65に結合すると推測した。PKC α がLSD1だけでなくp65を直接リン酸化する可能性もあるので、in vitroキナーゼ実験をp65を基質に行った。PKC α は、p65をリン酸化することができなかった(図3B)。これはLPS-PKC α シグナル伝達でPKC α の直接的な基質がp65でないLSD1であることを意味する。LSD1リン酸化がp65との結合

40

50

に重要であるか否かを確認するために、*in vitro*でリン酸化されたLSD1を使用してGSTプルダウン分析を行った。GSTプルダウン分析前に、リン酸化されたLSD1を得るためにPKC α を使用するキナーゼ実験を行った。GSTプルダウン分析結果、p65がリン酸化されたLSD1に直接結合して、フォスファターゼの処理がLSD1とp65との間の結合を略完全に除去するのを明らかにした(図3C)。このデータは、LPSが誘導したPKC α によるLSD1リン酸化が核内のp65との結合に必ず必要であることを意味する。

【0073】

mRNA-seq分析(図2)で得たように、Mcp-1及びIl-6の遺伝子がLSD1リン酸化依存的に発現した。LSD1リン酸化がNF- κ B標的プロモーターでLSD1及びp65のリクルート(recruitment)に影響を与えるか否かを確認するために、WT及びLsd1^{SA/SA}BMDM細胞で染色質免疫沈降(ChIP)分析を行った。ChIP分析結果、LPSで処理するとWT BMDMのMcp-1及びIl-6プロモーターでLSD1及びp65のリクルートが有意に増加したが、Lsd1^{SA/SA}BMDMではそれらのリクルートが弱くなることが見られた(図3D)。LPS処理がヒストンメチル化状態の変化を誘導するか否かを調べるために、LSD1によって調節されることができるヒストンH3K4またはH3K9メチル化状態を調べた(Shiet al., Cell. 2004; 119: 941-953)。WTとLsd1^{SA/SA}BMDM細胞のMcp-1及びIl-6プロモーターをChIP分析した結果、ヒストンH3K4me2及びH3K9me2水準が互いに類似することを確認した。これは、LPSによるLSD1リン酸化と関連した標的遺伝子活性化は、ヒストンの脱メチル化とは関係ないことを示す。一方、ヒストンH3K9アセチル化水準は、LPS処理時、WT BMDMでMcp-1及びIl-6プロモーターで増加したが、Lsd1^{SA/SA}BMDMでは増加しなかった(図3D)。LPS処理後Lsd1^{SA/SA}BMDMでTFであるp65が標的プロモーターにリクルートされないため、ヒストンH3K9アセチル化も増加しなかったと推測される。さらに、Raw264.7マクロファージでGo6976を処理するとMcp-1及びIl-6プロモーターに対するヒストンH3K9アセチル化、LSD1及びp65のリクルートが略完全に遮断された(図3E)。このようなデータは、LPS誘発LSD1のリン酸化がp65との結合に重要であり一部NF- κ B標的プロモーターのLSD1とp65リクルートをLSD1のリン酸化が制御することを示す。

【0074】

実施例4 LSD1によるp65の脱メチル化はp65タンパク質安定性向上に重要であることを分析

LSD1リン酸化がLPSに対する反応でp65を適切に標的プロモーターにリクルートするのに重要であるため、LSD1がp65をどのように調節するのかに焦点を合わせて研究を進めた。p65はK314/315部位がSET7/9メチル化酵素によってメチル化され、p65のメチル化はp65の分解を誘発することが明らかにされた(Yang et al., EMBO J. 2009; 28: 1055-1066)。しかしp65脱メチル化及びそれに伴うp65タンパク質の安定化を担う脱メチル化酵素の正体は知られていない。本発明者はまずLSD1がp65の脱メチル化を担うか否かを調べた。酵素活性が欠乏したLSD1 K661A(KA)突然変異体を利用して*in vivo*脱メチル化分析を行う前に、LSD1 KA突然変異体がp65との結合に影響があるからまず確認した。LSD1 WT及びLSD1 KA突然変異体は、LPS処理時p65と類似の結合の有無を示すが、リン酸化欠陥があるLSD1 S112A(SA)突然変異体はp65との結合に失敗した(図4A)。その後、p65の脱メチル化分析を行って、SET7/9によるp65のメチル化がLSD1WTによってなくなる一方、LSD1のSA又はKA突然変異体はp65メチル化をなくすることができないことを発見した(図4B)。LSD1 SA突然変異体は、WTと類似の脱メチル化酵素活性を有しているが、p65との結合にはLSD1のリン酸化が必要なので、p65を脱メチル化することができ

なかった。さらに、本発明者はK314/315部位にp65メチル化特異的抗体を用いて、*in vitro*脱メチル化分析を行って、SET7/9に誘導されたp65メチル化がリン酸化されたLSD1によって低下することを発見した(図4C)。このデータは、LPSに反応して、LSD1がp65の脱メチル化酵素(*demethylase*)として作用して、LSD1のリン酸化がp65に対する結合に重要であることを示す。LSD1リン酸化状態がp65タンパク質安定化に影響を与えるかを明確にするために、WT及びLsd1^{SA/SA}BMDMで核内のp65タンパク質水準を比較した。興味深いことに、Lsd1^{SA/SA}BMDMでLPS処理以後、核内p65タンパク質が検出されず、26Sプロテアソーム抑制剤であるMG132を処理するとLsd1^{SA/SA}BMDMの核内p65タンパク質発現が回復した(図4D)。さらに、Lsd1^{SA/SA}BMDMの核でMG132処理によって回復したp65タンパク質がメチル化されたp65であることも確認した(図4D)。これはリン酸化されたLSD1がp65に結合することができ、LSD1の脱メチル化酵素機能により核内のp65メチル化依存的なタンパク質分解を防げることを意味する。p65に対するユビキチン化実験も行われた。LSD1^{SA}またはKA突然変異の細胞内導入は、核でp65ユビキチン化を増加させたが、細胞質ではそのような現象が見られなかった(図4E)。さらに、PKC α の活性を遮断するGo6976またはLSD1の活性を遮断するGSK-LSD1の処理は、核でp65の*endogenous*ユビキチン化を顕著に誘導した(図4F)。一連のデータにより、本発明者はLSD1のリン酸化状態と脱メチル化活性がいずれもp65タンパク質の安定化に重要であるとの証拠を示した(図4G)。

【0075】

実施例5 PKC α -LSD1リン酸化軸は持続的な炎症反応を調節する軸として作用転写は、一連の転写因子の順次的段階によって調節される。LPS依存的転写モジュールの誘導は多くのTFによって調整される(Litvak et al., Nat. Immunol. 2009; 10: 437443)。NF- κ Bを含むclass I TFはLPS誘導2時間以内に炎症反応の開始を制御する。C/EBP δ を含むclass II TFは2時間のLPS刺激後*de novo*で合成されて、炎症シグナルの増幅のために後続で炎症反応関連遺伝子の活性化を調節する。PU.1及びC/EBP β を含むclass III TFは系統特異的転写調節因子である。すべてのTFはLPSで誘発された転写反応を調節するために互いに協力する。RNA-seq分析で、クラス1遺伝子を利用した*de novo*モチーフ分析を介して、主なTFとしてp65だけでなくPU.1及びC/EBPを確認した(図2D)。さらに、我々はCebpdをクラス1でLSD1リン酸化依存的な方式で誘導された遺伝子中一つであると確認した。class I TFとclass II TFが中継される時点である、LPS高容量投与後60分でLSD1のリン酸化が誘導されたので(図1)、LSD1リン酸化が後続シグナル活性化及び炎症反応の増幅を調節するとの仮説を立てた。従ってWT及びLsd1^{SA/SA}BMDMで炎症反応遺伝子の発現をLPS処理の経時的に分析した。興味深いことに、30分まで、WTとLsd1^{SA/SA}BMDMでMcp-1及びIl-6 mRNAの発現が類似したが、60分から120分まではMcp-1及びIL-6 mRNA発現がWTと比較して有意にLsd1^{SA/SA}BMDMで弱くなった(図5A)。さらに、Cebpd mRNA発現は、LPS処理後90分から、WTと比較してLsd1^{SA/SA}BMDMで有意に弱くなった(図5A)。LPS処理前にWT BMDMにGo6976の処理したことは、LPSが処理されたLsd1^{SA/SA}BMDMと類似したmRNA発現パターンが見られた(図5B)。またLSD1がリン酸化される時期であるLPS処理後60分から、p65がLSD1に結合するのを確認した(図5C)。これはLSD1によるp65の向上したタンパク質安定化が炎症反応遺伝子の持続的な活性化に重要であることを意味する。C/EBP δ は、炎症反応遺伝子の後続活性化のためのTFとして機能するので、我々はプロモーター占有の動力学を確認するために、LSD1、p65及びC/EBP δ 抗体を用いてLPS時間過程に亘ってChIP分析を行った。LPS処理後60分からLSD1はWT BMDMのMcp-1及びIl-6プロモーターにリク

ルートされたが $Lsd1^{SA/SA}$ BMDMではそうではなかった (図 5 D)。標的プロモーターに対する p 6 5 のリクルートは、LSD1 リン酸化が誘導されなかった LPS 処理後 30 分に WT 及び $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM 共に検出された。しかし LPS 処理後 60 分からは WT BMDM で p 6 5 リクルートが維持されるか増加したのに対し得、 $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM の Mcp-1 及び Il-6 プロモーターでは p 6 5 リクルートが有意に減少した (図 5 D)。このデータは、LSD1 リン酸化が LPS 処理の後半時点 (60 分以後) の p 6 5 リクルートを維持するのに重要な役割をすることを示す。また C/EBP δ は、WT BMDM で LPS 処理後 120 にリクルートされて、これは炎症反応の中継と増幅を誘導する (図 5 D)。それと並行して、Go 6976 の処理をすると、 $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM で得た ChIP 結果と類似の結果を得た (図 5 E)。このデータは、PKC α -LSD1-NF- κ B シグナルカスケードが、炎症反応遺伝子の転写活性化及び後続増幅をするために LPS 処理後 60 分から作動することを示す (図 5 F)

【0076】

実施例 6 p 6 5 の持続的な発現及びこれによる炎症の活性化は PKC α -LSD1-NF- κ B シグナル伝達カスケードに依存的であることを分析

我々は $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM で LPS 処理後 60 分から標的プロモーターの p 6 5 のリクルートが減少したものを観察したので、WT と $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM で経時による核内 p 6 5 タンパク質 endogenous 水準を確認した。LPS 処理後 30 分に WT と $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM で同じ p 6 5 タンパク質を検出して、これは LPS で誘導された p 6 5 の核に移動が $Lsd1^{SA/SA}$ BMDM で全く損傷しないことを意味する (図 6 A)。しかし核内 p 6 5 タンパク質は $Lsd1^{SA/SA}$ BMDMs でずっと維持されることができなく、LPS 処理後 120 分で C/EBP δ の de novo 合成も失敗した (図 6 A)。さらに、免疫蛍光分析結果、LSD1 WT-、SA-または KA-をいれた $Lsd1^{-/-}$ マウス胚芽線維芽細胞 (MEFs) に LPS を 30 分処理すると同じ水準の p 6 5 と観察される。しかし LPS を 120 分処理すると、LSD1

WT をいれた $Lsd1^{-/-}$ MEFs だけ核で安定化された p 6 5 タンパク質発現を示して LSD1 SA または KA 突然変異をいれた $Lsd1^{-/-}$ MEFs はそうではなかった (図 6 B)。核内 p 6 5 タンパク質水準の維持及び C/EBP δ の順次的 de novo 合成が PKC α -LSD1 シグナリング軸に依存することを追加で確認するために、Go 6976 または GSK-LSD1 で処理した核分画物で免疫ブロット分析を行った。Go 6976 または GSK-LSD1 の処理は、WT BMDM (図 6 C) または Raw 264.7 マクロファージ (図 6 D) で LPS 処理後 60 分で p 6 5 を安定化させるのに失敗した。さらに、MG132 の処理は、Go 6976 または GSK-LSD1 による核内に低下した p 6 5 タンパク質水準を回復させた (図 6 E)。このデータは、PKC α -LSD1-NF- κ B シグナル伝達カスケードが核内 p 6 5 タンパク質水準の維持及び C/EBP δ の順次的 de novo 合成に影響を与えて持続的な炎症反応の延長に重要であることを示す。

【0077】

実施例 7 マウスでの PKC α 活性または LSD1 活性の抑制による敗血症誘発による死亡率減少

Go 6976 または GSK-LSD1 の生体内効果を調べるためにマウスに Go 6976 または GSK-LSD1 を注入して肺組織を核分画した後、免疫ブロット分析を行った。Go 6976 または GSK-LSD1 注射すると、LPS を処理しても p 6 5 が核内に安定化されず C/EBP δ も新しく合成できなかった (図 7 A)。LPS 誘発全身炎症が WT 対照群より $Lsd1^{SA/SA}$ マウスでずっと低いため (図 1 A 及び 1 B)、さらに深刻な敗血症マウスモデルで以前の研究結果を再確認しようとした。LPS 注入及び盲腸を縛って穿孔を行う手術 (cecal ligation and puncture、以下 CLP) は、マウスでヒトの敗血症を模倣するのに広く使用されるマウスモデルである。LPS 注射は、敗血症の初期臨床的特徴を模倣して全身炎症を誘導するが、CLP

誘導性敗血症モデルは、排便が分泌されて免疫反応を引き起こすもので、ヒト敗血症と類似のサイトカインプロファイルを示すモデルである。年齢、性別及び体重が一致するWT及びLsd1^{SA/SA}マウスでCLP手術を介して、種々の菌株で誘発された敗血症誘導した。興味深いことにWTマウスはCLP手術以後、90時間以内に100%の死亡率を示すのに対して、Lsd1^{SA/SA}マウスは50%がCLP手術後144時間以上生存していた(図7B)。次にPKC α またはLSD1活性を遮断すると死亡率と肺損傷が減少する可能性を調べた。Go6976、GSK-LSD1又は同等体積の溶媒をCLP手術後12時間及び50時間に二回注射した。CLP手術以後、78時間内に溶媒だけ注入したマウスは100%死亡率を示したが、Go6976注入マウスの40%とGSK-LSD1注射マウスの50%だけが同じ期間中死亡して、このマウスはCLP手術以後144時間以上生存した(図7C及び7D)。このようなデータと一貫して、組織病理学的検査を介して、WTマウスがCLP後深刻な肺損傷及び肺胞損傷が見られるが、これらの反応はLsd1^{SA/SA}マウス、WTにGo6976またはGSK-LSD1注射されたマウスでは共に有意に減少したことを示した(図7E)。敗血症で炎症反応遺伝子の調節にGo6976またはGSK-LSD1処理が効果があるか否かを調べた。CLPによるMCP-1、IL-6及びTNF- α の上昇は、Lsd1^{SA/SA}マウス(図7F)、Go6976注入マウスまたはGSK-LSD1注入マウス(図7G)で有意に減少した。敗血症発病時全身炎症は、肝臓及び腎臓が主な標的臓器になり、多臓器機能不全を引き起こす場合が多い。CLPは、ALT(肝の損傷マーカー)、LDH(組織損傷マーカー)及びBUN(腎臓損傷マーカー)の血しょう水準を有意に増加させた。血しょう内ALT、LDH及びBUNの濃度は、WTマウス(図7H)と比較してLsd1^{SA/SA}マウスで有意に減少して、Go6976またはGSK-LSD1が注入されたマウスの血しょうでも同様に減少した(図7H、7I)。PKC α 活性またはその下位タンパク質であるLSD1活性を遮断すると、核内p65タンパク質安定性が減少して、従って敗血症時急性全身炎症が減少して生存率が増加することを発見した(図7J)。

【0078】

炎症反応は、侵入する病原菌に対する主な防御機構であり、病原菌によって誘発された疾病の発病を防ぐために病原菌が完全に除去される時まで維持されなければならない。一方、炎症反応は、敗血症のように過度な炎症の活性化による有害な影響もあるので、これを避けるため、病原体が除去された後に適時に終了しなければならない。従って過度な炎症反応がどのように検出されて維持されるのかに対する分子メカニズムを理解することが、敗血症誘発死亡率や臓器損傷を緩和するのに必ず必要である。本発明でPKC α によるLSD1リン酸化が、p65のタンパク質安定性を維持して、過度なLPS処理後持続的な炎症反応を維持するのに重要な役割をするとの証拠を示した。Lsd1^{SA/SA}マウスを利用した生体内研究を介して、激しい炎症反応でPKC α によるLSD1リン酸化の機能を解明できるようになった。LSD1のリン酸化が起きることができないLsd1^{SA/SA}マウスの場合、敗血症ショックで過度な炎症反応及び組織損傷を顕著に減少した。またGo6976またはGSK-LSD1処理は過度な全身性炎症反応を顕著に減少させて、PKC α 活性及びLSD1活性が炎症反応の活性化に決定的であることを証明した。PKC α -LSD1-NF- κ Bシグナル伝達カスケードが過度な炎症刺激に反応して炎症反応の増幅とそれに伴う敗血症を含む炎症性疾患の誘発に重要な役割をすることを確認した。

【0079】

高容量のLPSに反応するLSD1リン酸化依存性遺伝子に敗血症に関連した遺伝子及びClass II/III T_Hと関連した遺伝子が含むという点は重要である。クラス1のIL-6とMcp-1遺伝子は敗血症に関連したもので知られている遺伝子である(Rincon, Trends Immunol. 2012; 33: 571-577)。

興味深いことにCebpd^{-/-}マウスはWTに比べてLPS誘発急性肺損傷があまり見られなく、減少したIL-6遺伝子の発現を示し、これはLsd1^{SA/SA}マウスと類似の表現型であるといえる。

10

20

30

40

50

【0080】

PKC α -LSD1-NF- κ Bシグナル伝達カスケードが作動する時に現れるCebp mRNAの発現増大は、このシグナル伝達カスケードが炎症反応の後続増幅に決定的であり窮極的に敗血症につながることを意味する。本発明により、過度な炎症性刺激と炎症反応に伴う後成調節間の機能的つながりを見つけた。PKC活性剤であるPMAによって誘導された急性及び慢性炎症が以前に報告されたが、下位のPKC基質とその標的遺伝子は明らかになっていない。本発明により、PKC α が過度な炎症性刺激により核に入ってきてLSD1をリン酸化することを発見したので、PKC α が細胞質と核を連結して炎症反応の追加活性化のために外部の過度な炎症刺激を認知して伝達するセンサーとして機能をすると考えられる。過度な炎症性刺激によってLSD1がPKC α の基質になり、p65の脱メチル化酵素として機能してp65タンパク質の安定化が増大することを発見した。敗血症を誘発したLsd1^{SA/SA}マウスの表現型分析だけでなく、GSK-LSD1を使用してLSD1の活性を抑制するか、Go6976を使用してPKC α の活性を抑制すると、CLP手術による組織損傷が少なく生存率が高まることも立証した。たとえ初期段階で敗血症患者に対する抗生剤治療が死亡率を低くするが、敗血性ショックが起きる間過度な炎症反応自体を抗生剤が調節することはできない。抗生剤とともに、先述した過度な炎症反応を誘発するPKC α -LSD1-NF- κ Bシグナル伝達カスケードを標的にする薬物を共に使用すると、全身性炎症に進行される敗血症患者の新しい治療剤が開発できると考えられる。つまり、本発明により、炎症性疾患でPKC α -LSD1-NF- κ Bシグナル伝達軸が、可能性のある治療標的なり得ることを示す。

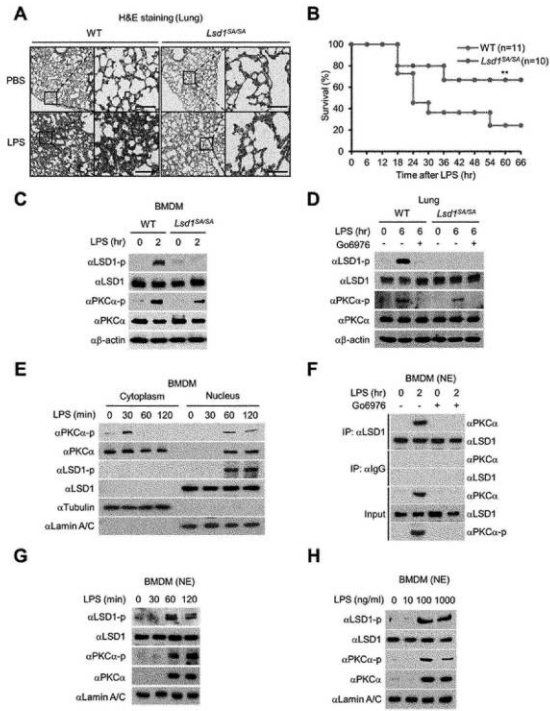
10

20

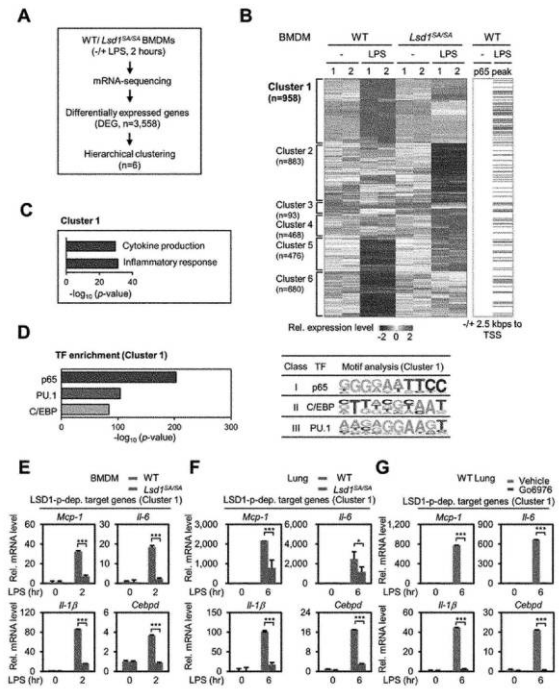
【0081】

本発明で使われるすべての技術用語は、特に定義されない限り、本発明の関連分野で通常の当業者が一般的に理解するようなものと同じ意味で使われる。本明細書に参考文献と記載されるすべての刊行物の内容は本発明に受け入れられる。以上、本願の例示的な実施例について詳細に説明したが、本願の権利範囲はこれに限定されず、次の請求範囲で定義している本願の基本概念を利用した当業者の様々な変形及び改良形態も本願の権利範囲に属する。

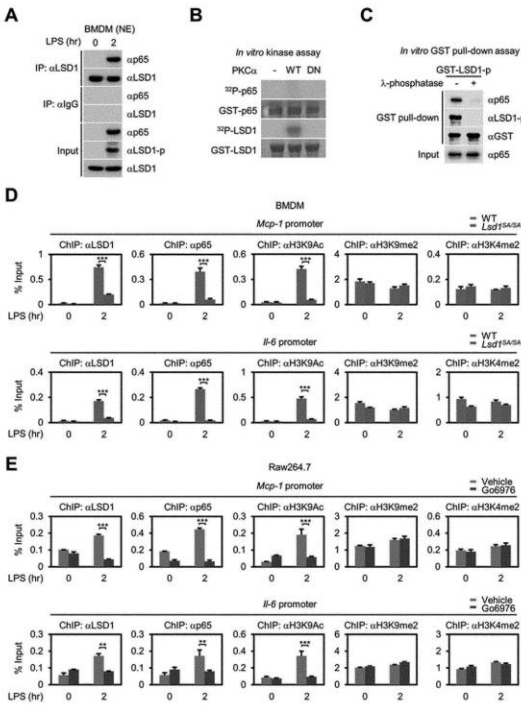
【図 1】



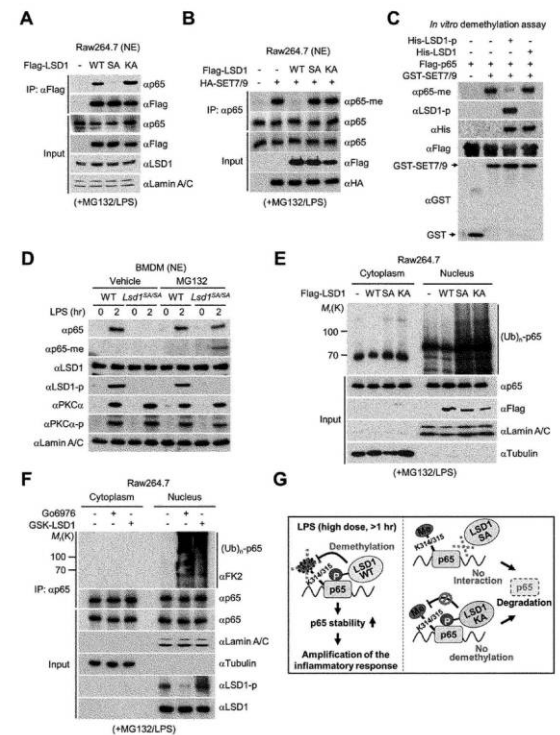
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 6】

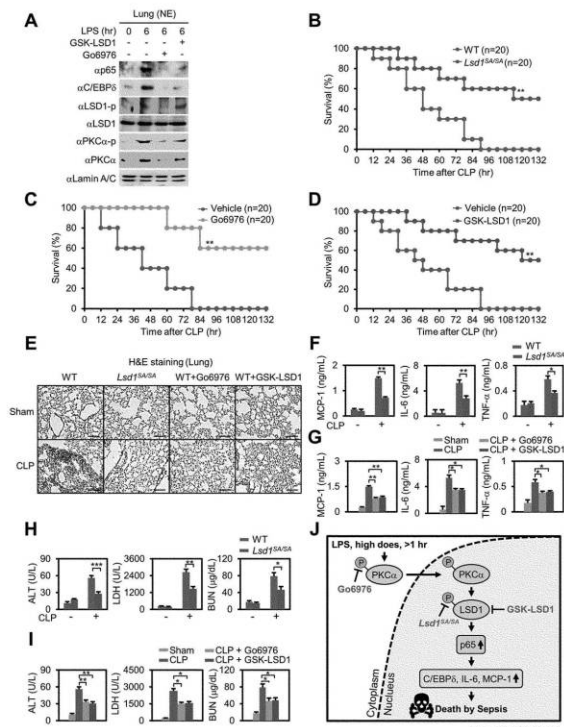
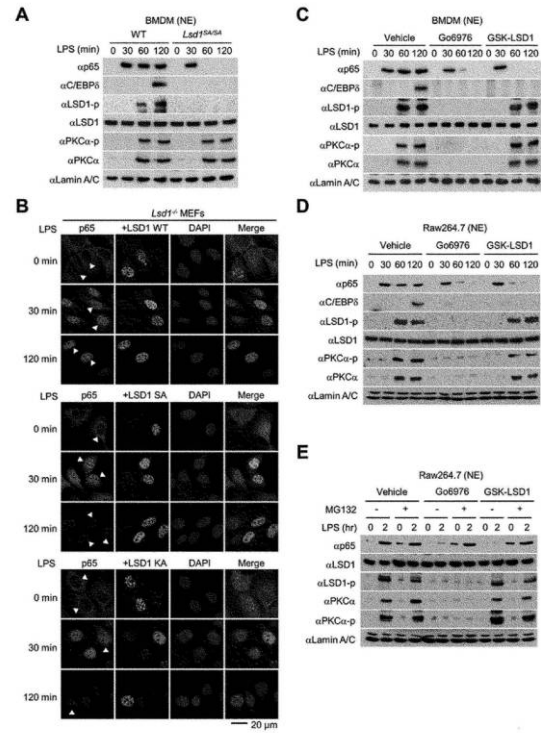


Figure 7 (Kim et al.)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
			G 0 1 N	33/53	D

特許法第30条第2項適用 2018年2月1日(ウェブサイトの掲載日2018年1月27日)に発行のMolecular Cell, 第69巻, 第3号 398-411頁(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29395062>) [刊行物等] 2018年5月14日に発行のソウル大学校大学院、博士学位論文、電子公開1-134頁

- (72)発明者 ベク ソンヒ
大韓民国 06276 ソウル ガンナムグ ソンルンーロ 221、405-304
- (72)発明者 ギム ドンハ
大韓民国 10099 ギョンギード ギンポーシ ゴルポ 1ーロ 11、101-203
- (72)発明者 ナム ヘジン
大韓民国 08819 ソウル クァナクーグ シルリムーロ 19ギル 50、302
- (72)発明者 ギム グンイル
大韓民国 06276 ソウル ガンナムグ ソンルンーロ 221、405-304

審査官 三好 貴大

- (56)参考文献 特開2004-198156 (JP, A)
特開平07-170998 (JP, A)
国際公開第2018/045422 (WO, A1)
米国特許出願公開第2013/0129845 (US, A1)
米国特許出願公開第2012/0202875 (US, A1)
米国特許出願公開第2007/0172957 (US, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)