

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：35307

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06785

研究課題名(和文)慢性炎症を駆動する細胞外インフラマソームの分子基盤と病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular bases and pathophysiological significances of the extracellular inflammasome which drives chronic inflammation

研究代表者

渡邊 政博(Watanabe, Masahiro)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号：10758246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症の原因となることが示唆されているHMGB1や終末糖化産物(AGEs)等の分子の作用メカニズムを解明するために、これらの分子と相互作用する分子の探索と機能解析を行った。その結果、サイトカインの一種であるTWEAKがAGEsと結合することを見出した。さらに、TWEAKとAGEsの相互作用が細胞機能に与える影響を解析したところ、TWEAKが抑制するTNF誘導性の炎症反応がAGEsの共存によって促進されることが見出された。これらの結果は、AGEsが炎症反応を制御するサイトカインの機能を抑制することで慢性炎症が形成されるメカニズムの存在を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms that HMGB1 or advanced glycation endproducts (AGEs) induce chronic inflammation, we searched for interaction partners of these molecules and investigated the effects induced by the interaction of the molecules. We found that AGEs directly interact with a cytokine, TWEAK. Furthermore, using cellular model, it was shown that AGEs inhibited function of TWEAK which regulate TNF-stimulated inflammatory reactions. These results suggested that AGEs induce chronic inflammation through inhibiting function of the cytokines which regulate inflammatory reactions.

研究分野：薬理学, 分子生物学

キーワード：慢性炎症 HMGB1 終末糖化産物 AGEs

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化の進展とともに、生活習慣病やメタボリックシンドローム、アルツハイマー病などの加齢に伴って進行する疾患への対策が大きな問題となっている。そのため、これらの疾患が生じるメカニズムの究明に対する社会の要請は大きい。近年、これらの疾患の基盤として、炎症の遷延（慢性炎症）が注目を集めつつある。

我々は、独自に発見した慢性炎症の病巣に出現する分子 High-mobility group box 1 (HMGB1) を標的とした新規治療法の創成を目指している。HMGB1 は通常核に局在するクロマチン結合タンパク質であり、細胞死に伴って細胞外へと放出され、免疫担当細胞の活性化に寄与すると考えられている。これまでに HMGB1 と同様の挙動を示す分子が複数同定されており、damage-associated molecular patterns (Damps) 分子と総称されている。これらの Damps 分子は、免疫担当細胞の表面に存在する Toll 様受容体や receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) などのパターン認識受容体を介して炎症反応を誘起すると考えられている。これまでに我々は、抗体による HMGB1 の遮断が脳梗塞などの病態を改善することを見出しており、治療標的としての有望性を示す知見が集積している。

一方で、HMGB1 の炎症局所における存在様式や、既知の炎症関連分子との関係は明らかになっていない。実際に Damps 分子は、分子同士が複合体を形成して細胞表面受容体 RAGE に作用することが既に示唆されている (Sims et al., Annu Rev Immunol., Vol. 28, pp. 367-388, 2010 など)。我々は、これらの知見に基づいて、Damps 分子に限らず Tumor Necrosis Factor (TNF) などの炎症関連分子や RAGE アゴニストである advanced glycation endproducts (AGEs) が HMGB1 を核とした複合体（細胞外インフラマソーム）を形成し、RAGE などの受容体への作用を介して炎症病態の制御に寄与している可能性に注目した。この可能性について検証するために、大腸菌発現系により作製した HMGB1 をプローブとして約 1 万種類のタンパク質を対象とした protein array 解析を実施したところ、TNF ファミリーに分類される分子を含む複数の分子が HMGB1 と相互作用する可能性が見出された。

RAGE アゴニストである AGEs は、生体内において糖とその代謝産物と生体分子との非酵素的な連鎖反応によって生成する分子である。AGEs は加齢や高血糖に伴い生体内に蓄積することが報告されている。さらに、RAGE を介して炎症反応の促進に寄与することから、HMGB1 と同様に疾患の形成に寄与することが示唆されている。過去に我々は AGEs と RAGE の相互作用に影響を与える因子をスクリーニングする系を独自に構築している。そこでこの系を用いて HMGB1 と相互作用する可

能性が見出された分子が、AGEs と RAGE との相互作用に与える影響を検討したところ、AGEs と RAGE の相互作用をこれらの分子が変化させることを見出した。

ここまでの検討結果は、細胞外において HMGB1 や AGEs を含む複数の分子が複合体を形成しており、炎症反応の制御に寄与している可能性（細胞外インフラマソームの存在）を強く示唆していると考えられた。

2. 研究の目的

慢性炎症病態を理解するためには、これらの病態の原因に介入することが強く示唆されている HMGB1 や AGEs の作用メカニズムを解明する必要がある。これまでに我々は HMGB1 や AGEs と相互作用する分子候補を見出しており、これらの分子の相互作用により細胞外インフラマソームが形成され、慢性炎症病態の形成に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では、これらの分子の相互作用について検証するとともに、この相互作用の細胞機能・病態形成への影響を解析することで HMGB1 や AGEs の作用メカニズムとしての細胞外インフラマソームの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 候補分子間の相互作用の検証

HMGB1 と相互作用すること、および AGEs と RAGE の相互作用に影響することを見出した分子（候補分子）についてタグ配列を付加したりコンビナント分子の大腸菌発現系を構築した。さらに、タグ配列を用いたアフィニティー精製と大腸菌に由来するエンドトキシンの除去手法を構築し、高純度の候補分子の組換え体を作製した。また、AGEs を固定化した担体を作製し、この担体と候補分子の組換え体を用いたプルダウンアッセイにより AGEs と候補分子間の相互作用の有無を検討した。また、これとは逆に、候補分子を固定化した担体を作製し、この担体と AGEs を用いたプルダウンアッセイを行い、前述の手法により得られた結果の検証を行った。

(2) 候補分子が単独で作用する細胞モデルの探索

論文検索により、候補分子が作用し何らかの活性を検出可能な細胞モデルを探索した。これらの細胞モデルにおいて、候補分子の受容体と RAGE の発現、候補分子を作用による細胞機能の変化を、mRNA レベル、タンパク質レベル、シグナル伝達系の活性の観点から評価する系を構築した。続いて、見出された細胞モデルにおいて、候補分子単独および AGEs を共存させた場合の細胞機能の変化について検討した。さらに、候補分子の生理的な作用メカニズムを細胞モデルにおいて再現した評価系を構築し、この系に対する AGEs の共存の影響について検討した。

(3) AGEs と候補分子の相互作用メカニズムの探索

候補分子と AGEs の相互作用メカニズムを探索するために、候補分子について一定の領域を欠損させたりコンビナント分子を作製し、(1)において構築したプルダウンの系を用いて AGEs との相互作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、候補分子のうち発現系の構築が順調に進行した TNF ファミリーに分類される分子 (TWEAK) に注目して集中的に解析を進めた。その結果、AGEs と TWEAK が直接的に結合することを見出した。

また、(2)の解析を進める中で TWEAK と同様に炎症性サイトカインに分類される分子 TNF および IL-8 についても TWEAK と同様のプルダウンアッセイを行う必要が生じた。そこで、これらの分子についても発現系を構築し、プルダウンアッセイに供した。検討の結果、IL-8 は TWEAK と同様に AGEs と直接的に結合すること、および TNF は結合しないことを見出した。この結果は、AGEs とサイトカイン分子の相互作用には選択性があることを示唆していると考えられた。

(2) TWEAK の刺激に应答し、AGEs の刺激に应答しない細胞モデルとして、血管内皮細胞モデルとして用いられる EA.hy.926 細胞を見出した。この細胞を TWEAK により刺激すると、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生が弱く促進される。この系に AGEs を共存させた場合、炎症性サイトカインの産生促進が強く抑制されることを見出した。この結果を直接的に解釈すると、AGEs は TWEAK による炎症反応の活性化の抑制に寄与することを示唆していると考えられた。しかし一方で、TWEAK の生理機能は完全に明らかになっていない。本研究における評価系においても TWEAK による炎症性サイトカインの産生促進の程度は、より一般的な炎症性サイトカインである TNF により誘導されるものと比較して低レベルであった。このことから、AGEs が TWEAK による炎症反応の活性化を抑制する現象は、生理的に生じている現象を反映しているのではない可能性が考えられた。

そこで、TWEAK の機能について過去の報告をより詳細に調査した。その結果、生体内における TWEAK の生理機能として、TNF による炎症反応の促進を抑制する現象が報告されていることを見出した。この現象は、本研究において用いた EA.hy.926 細胞においても生じることが確認された。そこで、この機能に対する AGEs の共存の影響を検討した。その結果、AGEs の共存により TWEAK による TNF の作用 (炎症反応の促進) の抑制が阻害され、TNF による炎症反応が促進されることが示された。

この結果と(1)の結果より、生体内に蓄積した AGEs は選択的にサイトカインと結合す

ることによって、炎症反応の制御の破綻に寄与している可能性が考えられた。この可能性は、当初の仮説である細胞外インフラマソームとは異なるものの、AGEs を含む慢性炎症病態の形成への関与が示唆されている分子群の未知の作用メカニズムの存在を示唆している (Watanabe et al., Mol Cell Biochem, *in press*)。

(3) ここまでの検討結果より、AGEs は TWEAK などのサイトカイン分子と直接的に結合することにより正常な生理機能の破綻を導いている可能性が示唆された。そこで、これらの分子の相互作用が生じるメカニズムを探索するために、TWEAK の N 末端および C 末端側から 20 残基ずつアミノ酸を欠損させたりコンビナント分子を作製し、プルダウンアッセイに供した。その結果、AGEs との相互作用に参与すると考えられる領域を見出すことに成功した (論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Advanced Glycation End Products Attenuate the Function of Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis to Regulate the Inflammatory Response. Mol Cell Biochem, *in press*, 査読有り, DOI: 10.1007/s11010-017-3045-6

[学会発表](計4件)

渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森秀治. AGEs と TNF 関連サイトカインとの相互作用部位の解析. 第 26 回 創薬・薬理フォーラム, 2016 年 12 月 17 日 岡山大学医学部(岡山県・岡山市)

渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森秀治. Damps 関連サイトカインの機能に対する AGEs の影響. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日~27 日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森秀治. AGEs 共存による Damps 関連サイトカイン類の機能変化. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日~29 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森秀治. HMGB1 と相互作用するサイトカインに対する

AGEs の影響 . BMB2015 第 38 回日本分子生物
学会 , 第 88 回日本生化学会合同大会 , 2015
年 12 月 1 日 ~ 4 日 神戸ポートアイランド(神
戸ポートピアホテル , 神戸国際会議場 , 神戸
国際展示場 , 神戸商工会議所)(兵庫県・神
戸市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 政博 (WATANABE , Masahiro)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号 : 10758246

(4) 研究協力者

森 秀治 (MORI , Shuji)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号 : 50220009

豊村 隆男 (TOYOMURA , Takao)

就実大学・薬学部・講師

研究者番号 : 40425137