

令和元年6月19日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10975

研究課題名(和文) 周術期炎症管理における新規診断・治療戦略の開発：レドックスバイオロジーの臨床応用

研究課題名(英文) Development of redox-based therapeutics against inflammation

研究代表者

松尾 禎之 (MATSUO, Yoshiyuki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50447926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：炎症や代謝異常が引き起こす細胞内酸化還元(レドックス)バランスの攪乱が原因となり、様々な疾患の発症や病態増悪につながる事が知られている。抗酸化タンパク質チオレドキシンの示す生体防御作用に着目し、チオレドキシンの高感度迅速測定系を確立した。またタンパク質のレドックス状態を可視化する技術を活用し、炎症と関連の深い小胞体ストレス環境下ではレドックス分子TMX1の酸化型への変換が起こることを見出し、ストレス応答の早期にレドックスバランスの変調を示す指標として機能することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オンサイトでの即時検査を可能にするチオレドキシンの自動測定系を確立した。迅速かつ高感度に生体内チオレドキシンのレベルを測定することが可能となり、周術期の様々な病態変化とチオレドキシンのレベルの関連を明らかにすることができれば、患者の状況把握、病勢判断、治療方針の決定、予後管理などに果たす役割は大きい。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence shows that oxidative stress is involved in the pathogenesis of a wide variety of human disorders, and the manipulation of cellular redox status has emerged as a promising therapeutic strategy to prevent an uncontrolled inflammatory response. To monitor the levels of oxidative stress, we have developed an advanced method for the rapid measurement of anti-oxidant protein thioredoxin utilizing a fully automated chemiluminescence analyzer.

We also demonstrated that cellular stress associated with protein accumulation induced the alternation of cellular redox balance in the endoplasmic reticulum, resulting in the oxidizing shift of thioredoxin-like protein TMX1. These findings suggest that the determination of TMX1 redox status could be useful to monitor the oxidative damage in the early phase of inflammatory response.

研究分野：ストレス応答

キーワード：炎症 ストレス レドックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大規模な外科手術や集中治療の現場において、重度の侵襲や感染症は全身性の過剰な炎症反応を引き起こし、術後合併症を伴う予後不良、さらには多臓器不全・ショックにより生命に深刻な危機をもたらす。したがって周術期の管理においては、治療の成否を決定する要因として、侵襲や感染に起因する炎症を適切にコントロールすることが極めて重要である。

申請者らは生体の酸化還元(レドックス)調節機能を担うチオレドキシシンおよびその関連分子の機能解析を通じて、レドックス制御分子による生体防御機構、特に炎症性疾患に対する保護的役割を明らかにしてきた。インフルエンザ感染、閉塞性肺疾患、接触性およびアレルギー性皮膚炎など、様々な疾患モデルにおいて、チオレドキシシン遺伝子の過剰発現や同タンパク質の投与が病態を改善することを報告してきた。チオレドキシシンは微生物から高等動物まで高度に保存されたタンパク質で、細胞内における抗酸化システムの一翼を担い、還元酵素としてシグナル伝達分子や転写因子等の活性制御に関わるなど、生体に必須の分子である。チオレドキシシンは酸化ストレスや感染等の刺激により発現が誘導されるいわゆるストレスタンパク質であり、一部の分子はシグナルペプチドに依存しない経路により細胞外へと分泌される。さらに細胞内小器官毎に特徴的なチオレドキシシンファミリー分子が存在しており、タンパク質の酸化還元反応を介して様々な細胞機能の調節を行うことが知られている。

チオレドキシシンは酸化ストレスや感染等の炎症反応により誘導され、様々なバイオストレスに対する生体防御因子として働く。また炎症や代謝異常が引き起こす細胞内レドックスバランスの攪乱が様々な疾患の発症や病態増悪につながるということが明らかとなるなど、生体の恒常性維持における細胞内レドックス制御機構の重要性が高まっている。

2. 研究の目的

炎症発生時における生体内チオレドキシシン関連分子の動態、および炎症反応の消長に果たす役割の解明を端緒として、ストレスの感知と制御の両面から、周術期診断と術後感染症の予防・治療に新たな道を拓く技術的・理論的基盤の構築を目的とする研究を構想した。侵襲に対する生体防御反応の1つとして、チオレドキシシンおよび類縁分子による炎症シグナルの制御機構に着目し、チオレドキシシンレベルと病態との関連性、およびレドックス反応に基づく抗炎症作用の分子メカニズムを明らかにする。

(1) 周術期管理におけるバイオマーカーとしてのチオレドキシシンの有用性検証のため、その体内レベルの変動を高精度かつ簡便に検出可能な測定システムを確立する。他の臨床パラメータとの相関、病態進展度・治療効果との関連性などについて詳細に解析することにより、外科的侵襲・感染などのストレスを反映する指標としてチオレドキシシンが機能する可能性を探る。

(2) 侵襲や感染によって引き起こされる炎症反応を反映する実験モデルを構築し、チオレドキシシンやレドックス関連分子を介した生体防御機構を明らかにする。チオレドキシシンファミリー分子の作用部位や炎症関連分子の動態について解析を行い、炎症性障害克服に向けたエビデンス構築を目指す。

以上より侵襲に対する防御反応としてのレドックス制御の重要性、生理的・臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

周術期侵襲における炎症診断マーカーおよび治療ツールとして、レドックス関連分子の動態把握と炎症シグナルの制御に果たす役割の解明を目指す。

(1) チオレドキシシンレベルの短時間変動を検出可能な高感度迅速測定系の樹立

従来のELISA法(固相化抗体による呈色反応)に代わるチオレドキシシン定量法として、小型化学発光自動分析装置POCubeを用いたチオレドキシシン測定系の評価を行う。サンプル調製法や測定手法の最適化(希釈率、反応ボリューム、保管温度、反応阻害物質の選定など)を行う。組換えヒトチオレドキシシンタンパク質を標準物質として、従来法との比較により、検出感度や定量性について評価を行い、臨床サンプルを用いたチオレドキシシン高精度測定系を確立する。

(2) レドックス反応を介した炎症応答調節機構の解明

炎症性サイトカインの産生源とされる免疫系細胞や組織間質を構成する細胞、血管内皮細胞や上皮組織由来細胞などを対象として炎症応答モデルを設定する。

菌体成分やDAMPs(Damage-Associated Molecular Patterns)の刺激により、高度侵襲や敗血症等の感染を模した細胞モデルにおいて、チオレドキシシン関連分子の動態把握、炎症性サイトカインの発現誘導・分泌に対するチオレドキシシン投与の影響を検証する。シグナル伝達分子のリン酸化や局在変化、セカンドメッセンジャーの変動(カルシウムイオン、活性酸素等)、膜電位変化、細胞内代謝の変動などを指標に解析を行う。

4. 研究成果

従来のELISA法(固相化抗体による呈色反応)に代わるチオレドキシシン定量法として、小型化学発光自動分析装置POCubeを用いたチオレドキシシン測定系を開発した。本技術は液相での免疫反応と化学発光(CLEIA法)に基づき、カートリッジ方式により様々な生理活性物質を半自動的に

測定することが可能である。組換えヒトチオレドキシタンパク質を標準物質として、同一の抗体ペアを用いた ELISA 法との比較を行ったところ、従来法と同等以上の測定感度を示した。血漿サンプルを用いた予備検討において、検体採取法、希釈率、反応量等に関する条件設定を行い、定量性に問題がないことを確認した。

またタンパク質の定量と平行して、チオレドキシンの酵素活性を評価するシステムを構築した。蛍光標識されたインスリンを基質として、還元に伴う蛍光シグナルの変化をモニタリングすることにより、従来の吸光度測定と比較して感度の大幅な向上が認められた。これらの高感度計測システムは、生体サンプルを用いた測定においてしばしば問題となる夾雑物質による反応阻害や感度低下の問題を解決する有効な手段となることが期待された。

炎症や代謝異常が引き起こす細胞内レドックスバランスの攪乱が原因となり、様々な疾患の発症や病態増悪につながるということが知られている。タンパク質は細胞の内外において様々な酸化的修飾を受けるが、中でも2つのチオール基の酸化により生じるジスルフィド結合(S-S結合)の形成はタンパク質の高次構造の安定化やサブユニットの会合に必要であるばかりでなく、立体構造の変化を誘導し活性のオン・オフに関わる分子スイッチとしてタンパク質の機能発現に重要な役割を果たしている。そこで細胞内レドックスバランスの制御に関わるチオレドキシファミリー分子に着目し、炎症等のストレス環境下での酸化還元酵素のレドックス状態の変動について、チオール特異的プロープによる修飾と電気泳動法を組み合わせる手法により解析を行った。

炎症による細胞障害や代謝制御異常と関連の深い小胞体ストレスが細胞内レドックス環境に及ぼす影響を検討したところ、小胞体へのタンパク質の蓄積によりレドックスバランスの攪乱が引き起こされ、小胞体膜上に存在するチオレドキシ関連分子 TMX1 が酸化型に変換されることを見出した。このとき活性酸素種(ROS)の発生はほとんど認められず、ROSの産生を促す薬剤は TMX1 の酸化還元状態に影響を与えなかったことから、酸化型へのシフトは ROS による酸化的ダメージによるものではないと考えられた。また小胞体ストレスによる TMX1 の酸化型への変換と並行し細胞内グルタチオン(GSH)濃度の低下が認められ、GSHの合成阻害により TMX1 の酸化が促進された。TMX1 の酸化シフトは可逆的反応であり、小胞体ストレスからの回復期において、GSHレベルの上昇とともに TMX1 の速やかな還元型への変換が誘導された。

炎症等のストレス環境下においては酸化還元(レドックス)バランスの攪乱が原因となり、代謝異常や細胞死など病態増悪につながるということが報告されている。従ってタンパク質の酸化還元状態の変動を知ることは、各々の分子の機能のみならず細胞のコンディションを反映する指標として我々に有用な情報を与えてくれる。本研究では低分子抗酸化物質のレベルおよび酸化還元酵素のレドックス状態に着目することにより、それらがストレス応答の早期にレドックスバランスの変調を示す指標として機能することを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Kusunoki M, Shoji T, Uba T, Adachi T, Iwai K, Nishi K, Harada H, Bono H, [Matsuo Y](#), [Hirota K](#). Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity. *Sci Rep*. 2018;8(1):8987. 10.1038/s41598-018-27220-8 査読有

[松尾 禎之](#), [広田 喜一](#). 小胞体内レドックスバランスの維持機構. *細胞*. 2018;50(4):208-9. 査読無

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Nishi K, Kusunoki M, Shoji T, Uba T, [Matsuo Y](#), Adachi T, Hayashi JI, Takenaga K, [Hirota K](#). Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0192796. 10.1371/journal.pone.0192796 査読有

[Matsuo Y](#), [Hirota K](#). Transmembrane thioredoxin-related protein TMX1 is reversibly oxidized in response to protein accumulation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Open Bio*. 2017;7(11):1768-77. 10.1002/2211-5463.12319 査読有

Yodoi J, [Matsuo Y](#), Tian H, Masutani H, Inamoto T. Anti-Inflammatory Thioredoxin Family Proteins for Medicare, Healthcare and Aging Care. *Nutrients*. 9 (2017) pii: E1081. 10.3390/nu9101081 査読有

Okamoto A, Sumi C, Tanaka H, Kusunoki M, Iwai T, Nishi K, [Matsuo Y](#), Harada H, Takenaga K, Bono H, [Hirota K](#). HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. *Sci Rep*. 2017;7(1):3816. 10.1038/s41598-017-03980-7 査読有

Inada T, Sumi C, [Hirota K](#), Shingu K, Okamoto A, [Matsuo Y](#), Kamibayashi T. Mitigation of inflammation using the intravenous anesthetic dexmedetomidine in the mouse air pouch model. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2017 39:225-232. 10.1080/08923973.2017.1327964 査読有

[松尾 禎之](#), [広田 喜一](#). 「酸素はいつも足りていない」の生物学の建設 - 2016 年度アル

バート・ラスカー基礎医学研究賞の発表に寄せて. Life Support and Anesthesia. 2017;24:194-6. 査読無

Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Hirota K. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. Sci Rep. 2016 6: 34424. 10.1038/srep34424 査読有

Okamoto A, Tanaka M, Sumi C, Oku K, Kusunoki M, Nishi K, Matsuo Y, Takenaga K, Shingu K, Hirota K. The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. BMC Anesthesiol. 2016;16(1):104. 10.1186/s12871-016-0273-3 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

田畑 凱光、松尾 禎之、広田 喜一 炎症が惹起する代謝リプログラミングの分子機序の探求 第 15 回 がんとハイポキシア研究会 千葉市 2018/11/09

松尾 禎之、広田 喜一 グルタチオンシステムと連動した小胞体酸化還元酵素の活性制御およびレドックス恒常性維持の分子機構解析 第 15 回がんとハイポキシア研究会 淡路市 2017/11/10

松尾 禎之、広田 喜一 小胞体内レドックスバランスの維持とストレス感知機構の解析：タンパク質のレドックス状態を指標としたストレスモニタリング 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会 つくば市 2017/6/28

松尾 禎之、広田 喜一 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜市 2016/11/30

松尾 禎之、広田 喜一 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング 第 14 回がんとハイポキシア研究会 岐阜市 2016/11/5

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：広田 喜一

ローマ字氏名：(HIROTA, Kiichi)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00283606

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。