

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15763

研究課題名(和文) DAMPs存在の2様式：naked型とexosome型. その意義

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of two types of DAMPs, naked- and exosomal type.

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Damage associated molecular patterns, DAMPsは主として障害を受けた細胞から放出され、代表的にはヒストン類やHMGB1が挙げられる。ヒストンに関してはフリー(naked)状態で細胞外に放出される場合と、exosome内に内包されて放出される場合のあることが判明したが、HMGB1に関しては多くはnaked状態での放出であると考えられた。これは、ヒストンの場合にはARDSなどの単臓器の、HMGB1の場合には全身性の血管内皮細胞障害に基づく“播種性”血管内凝固症候群のメディエータとして働くという、病態発現の違いの一部を形成している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Damage associated molecular patterns, DAMPs, are released from the damaged or stimulated cells and act on various types of cells through toll like receptors. These result the various cellular events including inflammasome activation. We investigated the molecular and cellular basis of DAMPs. We showed that DAMPs released from the cells by free molecular form, and/or enwrapped into the exosome. We identified that there are two types of DAMPs, naked, free molecule form and exosomal form.

In this project, we investigated the pathophysiological differences among two types of DAMPs, histones and HMGB1. We showed that HMGB1 was mainly present with the naked form. However in the case of histones, there are two types, naked and exosomal types. These may explain that exosomal histones are targeted to the remote organs resulting organs damages, including ARDS. However, naked HMGB1 may circulate and play roles for the development of systemic pathologic states including DIC.

研究分野：血液凝固学、生体侵襲学

キーワード：DAMPs HMGB1 Exosome DIC ARDS Organ failure

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の生存には、各臓器間の細胞同士のコミュニケーションのみならず、臓器を超えた細胞間のコミュニケーションが必須であり、その円滑な運行により、生体の統合性としなやかな恒常性が保障される。多臓器生物であるヒトの場合には、その階層だった構築は図1のように、遺伝子—細胞—組織—臓器—個体という各コンポーネントがヒエラルキーを持って互いにコミュニケーションしており、その各階層の情報の伝達は、一つは神経系、あと一つは脈管系(血管系とリンパ管系)によって連絡されている。

これまで、細胞間のコミュニケーションすなわち、cellular levelでの相互連関は蛋白質類と脂質メディエーターによって営まれるとみなされてきていた。しかし、最近になり cellular 相にエクソソーム(exosome)をはじめとする extracellular vesicles(細胞外小胞)が存在することが明らかになってきた(図1)。

エクソソームは直径数10~100ナノメートル前後の膜構造を有した細胞外小胞であり、これが新たな細胞間の情報伝達の手段であることが明らかになってきた。換言すれば、エクソソームは subcellular phase と見なすこともできる。

本研究では、この細胞外小胞のうち、エクソソームに関してその放出機構と細胞外での存在様式、および活性と各種病態との関連について研究した。

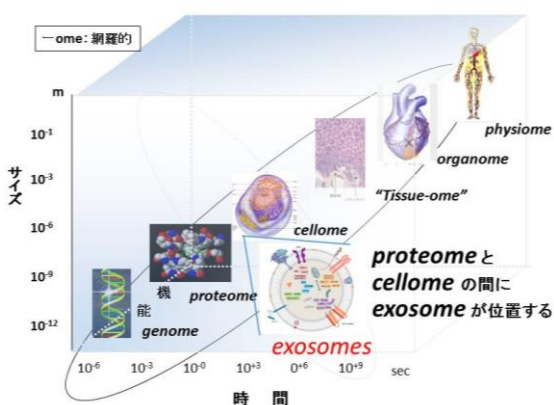


図1. novel logistic system としての exosome

2. 研究の目的

壊死細胞は Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) を細胞外に放出して Systemic Inflammatory Response

syndrome (SIRS)、Disseminated Intravascular Coagulation(DIC)、Adult Respiratory Distress syndrome (ARDS)、Multiple Organ Failure (MOF)などを誘発する。これはその由来と活性から、alarmin と包括されることもある。

しかし alarmin-DAMPs は免疫誘導、止血、修復など生体に有利な作用をも発揮する。この場合、局所的 DAMPs の場合には生体に有益な作用を発揮することが多いが、全身循環性の DAMPs は生体にとって有害な作用；ショックや播種性血管内凝固症候群(DIC)、あるいはこれらに伴った多臓器不全(MOF)などの原因となることが多い。

本研究では『DAMPs の存在には2つの様式: exosomal type と naked type があり、前者の exosome 内包性 DAMPs の場合には、exosome の表面糖鎖が遠隔臓器に発現している特異的レクチンにより認識されて特定部位に“標的化”され、限局性に機能を発揮し、全身性作用は発揮しない。一方、細胞外に DAMPs 分子が裸の状態で放出された場合(ここでは naked DAMPs と称する)には、全身性の有害作用を発揮する。しかし naked DAMPs でも、HMGB1 とヒストンの場合には内皮細胞上に広く発現しているトロンボモジュリン(thrombomodulin)によって捕獲され(図2)、その全身性循環は防御されている』(図2・図3)という DAMPs 活性発現のダイナミックモデルを提唱する。

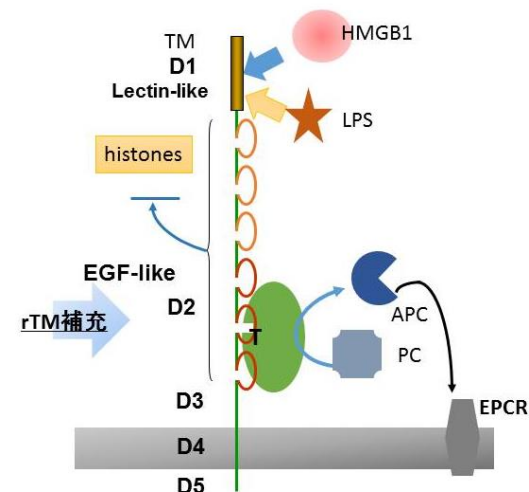


図2. 内皮細胞上のトロンボモジュリンによる DAMP (HMGB1, histones)、PAMPs (エンドトキシン)-barricade

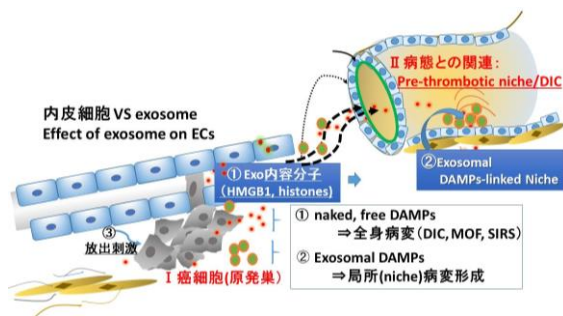


図3. 作業仮説：DAMPsの2存在様式、naked DAMPsとexosomal DAMPsと病態形成

3. 研究の方法

本研究では、培養細胞（ヒト血管内皮細胞、ヒト悪性黒色腫細胞 A375）の上清と、超遠心法で得られた exosome rich 分画を解析した。すなわち超遠心分画の上清を naked DAMPs 用、培養液を段階的に超遠心して得られた沈殿分画を exosome 分画用として使用した。なおこの沈殿分画に exosome が含まれていることは電顕で確認した。このようにして得た分画のうち、未処置の培養上清に含まれる DAMPs を naked DAMPs、超遠心で得られて沈殿層に回収された DAMPs を exosomal DAMPs と見なして、本研究に供した。

研究の作業仮説としては、フリーの、すなわち naked DAMPs は全身性に作用して、ショックや SIRS、DIC、MOF など全身性の病態発現のリスク因子として、一方後者の exosomal DAMPs は限局された部位の、ニッシェ病巣 (niche pathologic lesion) 形成に役割を果たすというものである。すなわち、最もリスクの高い HMGB1 とヒストンは血管内皮細胞のトロンボモジュリン (TM-protein C) によってブロックされ (図3)、作用は限局化されるものの、TM バリケードを逸脱、あるいは越境した HMGB1 とヒストンは、全身性に作用して、全身性病態の発現因子として働く可能性がある。しかるに、後者の【exosomal DAMPs; HMGB1 とヒストンは、表面糖鎖-末梢臓器、組織細胞上のレクチンの相補的關係で標的化され、DAMPs 発生の根源である “niche formation factor”、あるいは、原発病巣の damage に対して防御的応答をする】という仮説で、本研究はこの作業仮説の妥当性、整合性の証明であった。

4. 研究成果

患者血液サンプル中に naked DAMPs、exosomal DAMPs が存在することの証明

(1) HMGB1

エクソソームの表面糖鎖の中には高マンノース型糖鎖が発現しており、ある種の海藻レクチンにより、エクソソームは吸着されるということは証明済であった。さらに本レクチン固相化バイオチップで、exosome を効率よく分離定量出来る装置を開発したので、これを用いて超遠心法で得られた分画から高効率にエクソソームを分取した。これにより培養細胞（ヒト血管内皮細胞、A375）の培養上清とエクソソーム分画を SDS で可溶化して解析に供した。

そして、免疫泳動法と immuno-blot で、HMGB1 とヒストンに関して解析した。また特異的レクチンの affinity バイオチップで回収した exosome について、HMGB1 とヒストンの immunoblot 法で解析した。さらに、miRNA の解析も行った。

結果として、HMGB1 に関しては、培養上清中には検出されたが、超遠心分画、すなわち exosome 内には検出されなかった。しかし exosome を可溶化して、HMGB1-ELISA 法で解析すると、微量の HMGB1 が回収されたので、極微量の HMGB1 は exosome 内にも存在するものと結論された。

(2) ヒストン

ヒストンに関しては、培養上清中にも、exosome 分画にもヒストンは検出された。現在解析中であるが、全てのヒストン (histone1-2A, -H2B, -H3, -H4) が exosome 内に含有されているものと考えられた。in vitro の実験ではヒストンはトロンボモジュリンと結合した (図2) が、結合様式 (結合部位、結合の比率など) は現在、解析中である。動物実験、あるいはヒト臨床例で、遺伝子組み換え体のトロンボモジュリンを投与すると、DIC、MOF、ショックなどの病態が軽減するのは、トロンボモジュリンのヒストン結合によるものであると、考えている。

今後の問題点としては、exosome が細胞に結合した後、細胞内に内包 DAMPs のシグナルを入れるか否かが重要な点であり、現在、解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Tancharoen S, Gando S, Binita S, Nagasato T, Kikuchi K, Nawa Y, Dararat P, Yamamoto M, Narkpinit S, Maruyama I. HMGB1 Promotes Intraoral Palatal Wound

Healing through RAGE-Dependent Mechanisms.
Int J Mol Sci. 査読有. 2016 Nov 23;17(11).
pii:E1961.
DOI:10.3390/ijms17111961

②Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I.
HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin.
Obesity(Silver Spring). 査読有.2016;24(9):1913-21.
DOI:10.1002/oby.21549.

[学会発表] (計4件)

①丸山征郎、「感染防御とその破綻のシステムバイオロジー」、第13回九州小児免疫フォーラム、2017年3月4日、ホテルセントラザ博多(福岡県福岡市)

②Ikuro Maruyama, Takashi Ito,
”Thrombin-thrombomodulin system in the hemostatic system and its clinical implication”, The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, 2016年10月21日、日本平ホテル(静岡県静岡市)

③丸山征郎、「血栓形成に関する新しい機序とトロンビンの役割」、第120回日本循環器学会九州地方会、2016年6月25日、ホルトホール大分(大分県大分市)

④丸山征郎、「救急患者体内の役者達：PAMPs/DAMPsそしてRAMPs」、第20回日本救急医学会九州地方会、2016年6月4日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号：20082282

(2)研究分担者

原田 陽一郎 (HARADA, Yoichiro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80464147

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：20381171