

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00882

研究課題名(和文)細胞外dATPマクロファージに対する貪食・細胞障害性機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of phagocytosis / cytotoxic mechanism by extracellular dATP for macrophages

研究代表者

澤 智華 (Sawa, Chika)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80422541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：10種類のヒト腫瘍由来培養細胞に対する細胞外核酸の細胞増殖障害の解析により、MCF-7のみに特異的に増殖障害が認められた。その障害はアポトーシスではなく、細胞周期S期の停滞が認められた。塩基特異性は認められなかった。一方マクロファージに関してdATPのみマクロファージを活性化した。核酸感受性は腫瘍細胞よりマクロファージの方がはるかに感度が高く、THBS-1や様々なサイトカイン類の発現を誘導した。現在これら基礎データを元に褥瘡モデルマウスにてin vivoの検証を行っている。ヒト腫瘍細胞の解析は2021年に論文発表し、マクロファージに対する解析は組織解析後に論文化する計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は体内で常時放出される自己DNAの役割を研究している。これまで自己DNAのため速やかに代謝され悪影響を及ぼさないと考えられており、詳細な役割は明らかとなっていない。本研究では腫瘍の壊死や好中球から放出される局所的高濃度核酸を解析した。その結果ある特異的な細胞には増殖阻害を起こし、マクロファージを活性化することを明らかにした。この結果は将来腫瘍や炎症における細胞壊死(褥瘡など)の解析に新たな知見を及ぼすと考えられる

研究成果の概要(英文)：Analysis of cell proliferation disorders of extracellular nucleic acids in cultured cells derived from 10 types of human tumors revealed proliferation disorders specifically only in MCF-7. The disorder was not apoptosis, but stagnation in the S phase of the cell cycle was observed. No base specificity was observed. On the other hand, regarding macrophages, only dATP activated macrophages. Nucleic acid sensitivity was much higher in macrophages than in tumor cells, inducing the expression of THBS-1 and various cytokines. Currently, we are conducting in vivo verification using pressure ulcer model mice based on these basic data. The analysis of human tumor cells was published in 2021, and the analysis for macrophages will be published after histological analysis

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外核酸 マクロファージ 細胞増殖阻害

1. 研究開始当初の背景

本研究は細胞代謝や自然防御時において好中球の破裂や炎症細胞・腫瘍細胞の壊死の際に放出される「核酸」、特に“dATP”を研究対象とした。

核酸は主に肝臓と腎臓の一部でアミノ酸などからデノボ合成されるが、加齢に伴い十分な核酸合成ができなくなる。近年その補充として経口摂取した核酸を再利用するサルベージ合成が担っていると考えられ、これに基づき核酸サプリメントの摂取がアンチエイジングに対する効果があると信じられている。その他、核酸の抗酸化作用による関節リウマチに関する報告、免疫調節作用の期待により市販の乳児用粉ミルクにはサケ白子由来の核酸が含まれている。しかしこれらの研究は主に動物実験から得られた体内動態を検証するものであり、詳細な分子レベル的機序解析は不明のままであった。

2. 研究の目的

研究代表者は核酸の経口摂取で細胞が反応するかどうか疑問が残っていた。なぜなら当初得ていた *in vitro* で培養細胞が反応する核酸濃度は 1mM であるが、実際の Cell free DNA 血中濃度は 100nM であるからである。そのため“細胞外核酸が高濃度に存在するのはどこか？”それは炎症細胞や好中球が破裂・壊死する際に核酸が大量に放出される部位で、そこで暴されるのマクロファージではないかと考え、腫瘍やマクロファージに対する細胞外核酸の影響を研究目的とした。

3. 研究の方法

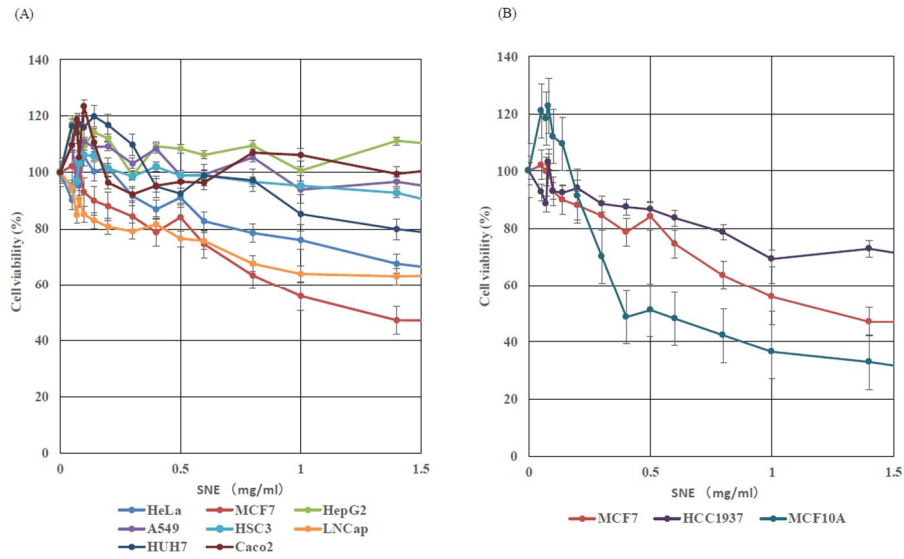
腫瘍に対する細胞外核酸の解析は 10 種類以上のヒト培養細胞に白子由来の核酸を添加し MTT Assay により細胞増殖障害を解析した。さらに FAC を用いて細胞周期とアポトーシスを解析した。

マクロファージに対する解析はヒト単球 U937 細胞株を PMA 添加によりマクロファージ様細胞に分化させた後、核酸（白子由来核酸と dATP）を添加して様々な遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

10 種類のヒト腫瘍由来培養細胞に対する細胞増殖障害の解析により、乳がん細胞 MCF-7 のみに特異的に増殖障害が認められた（図 1）。その障害はアポトーシスではなく、細胞周期 S 期で停滞することによることを明らかにした。さらにこの細胞増殖障害の塩基特異性は認められなかった。一方マクロファージに関しては塩基特異性が認められ dATP のみマクロファージを活性化した。核酸感受性は腫瘍細胞よりマクロファージの方がはるかに感受性が高く、THBS-1 や様々なサイトカイン類の発現を誘導した。現在これら細胞レベルの基礎データを元に褥瘡モデルマウスにて *in vivo* の検証に展開している。細胞外核酸のヒト腫瘍細胞の解析は 2021 年に論文発表した。(Heliyon DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e08318) マクロファージに対する解析は動物実験による組織解析後に論文化する計画である。

この研究期間では毎年日本解剖学会にて進捗状況をポスターにて発表を行った。



☒ 1

The water-soluble nuclear crude extract (SNE) suppresses some cancer and noncancer cell growth *in vitro*.

Cells were treated with indicated doses (0–1.5 mg/ml) for 4 days. The viability was assessed by MTT assay. (A) HeLa (uterine cervix), MCF7 (breast), HepG2 (liver), A549 (lung), HSC3 (tongue), LNCap (prostate), HUH7 (liver), Caco2 (colon), HLE (liver). (B) MCF7 and HCC1937 from breast cancer, and MCF10A from noncancer breast cells. Values are mean \pm SD of three independent experiments, each dosage in triplicate. All the used doses are statistically significant as determined by the Student-t-test (** $P < 0.05$). For the sake of simplicity, asterisks (**) are not reported in the graph.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Yuriko, Ezure Hiromitsu, Ito Junji, Sawa Chika, Yamamoto Masato, Hata Harumi, Moriyama Hiroshi, Manome Yoshinobu, Otsuka Naruhito	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of Silica Nanoparticles on Cultured Central Nervous System Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 146 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/wjns.2018.82013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Yuriko, Ezure Hiromitsu, Ito Junji, Sawa Chika, Yamamoto Masato, Wakatsuki Mone Hatasa, Hata Harumi, Sasaki Akiko, Takayanagi Masaaki, Takaki Takashi, Tanaka Mikako, Moriyama Hiroshi, Otsuka Naruhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Changes in Health Consciousness of Nursing Students in Japan after Acquiring Medical Care Knowledge from a Nursing School	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Journal of Nursing	6. 最初と最後の頁 794 ~ 800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojn.2021.119066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawa Chika, Yofu Sachiko, Kiriyama Keisuke, Sutoh Keita, Saito Tomomi, Kishi Satomi, Gunji Mariko, Inoue Yuriko, Sugi Masahito, Shioda Seiji, Honda Kazuho	4. 巻 7
2. 論文標題 High concentration of extracellular nucleotides suppresses cell growth via delayed cell cycle progression in cancer and noncancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08318 ~ e08318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤智華、佐野真理子、井上由理子、杉 正人、本田一穂
2. 発表標題 細胞外核酸による血管内皮細胞に対する影響
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤智華、佐野真理子、井上由理子、杉 正人、本田一穂
2. 発表標題 細胞外核酸による創傷治癒効果の組織学的検討
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤智華、佐野真理子、井上由理子、杉 正人、本田一穂
2. 発表標題 核酸による創傷治癒効果の組織学的検討
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 由理子、上窪 裕二、山名 智人、江連 博光、伊藤 純治、澤 智華、畑 春実、森山 浩志、大塚 成人
2. 発表標題 Synaptotagmin1の大量発現および発現阻害による培養神経細胞の形態変化
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野真理子、澤智華、向井俊平、高木孝士、本田一穂
2. 発表標題 培養内皮細胞を用いた血管内皮細胞傷害時のGlycocalyxの変化とその意義
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 由理子、江連 博光、森山 浩志、伊藤 純治、澤 智華、白石貢一、馬目佳信、井上明男、大塚 成人
2. 発表標題 Mnイオンの神経活動依存的な神経細胞内への取り込みと排出に関する解析
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤智華、佐野真理子、井上由理子、杉正人、本田一穂
2. 発表標題 細胞外核酸の細胞障害性に対する検討
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上由理子、江連博光、森山浩志、伊藤純治、澤智華、白石貢一、馬目佳信、井上明男、大塚成人
2. 発表標題 アミロイド大量発現マウスを用いたMn-MRI法によるアルツハイマー病の病因と病気の進行度の解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野真理子、澤智華、向井俊平、高木孝士、本田一穂
2. 発表標題 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いたGlycoalyxの検出方法の検討
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田一穂、向井俊平、佐野真理子、南雲佑、澤智華、高木孝士
2. 発表標題 低真空走査電顕 (LV-SEM) による腎パラフィン切片の三次元的解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上由理子、江連博光、森山浩志、伊藤純治、澤智華、白石貢一、馬目佳信、井上明男、大塚成人
2. 発表標題 Synaptotagmin1の大量発現および発現阻害による培養神経細胞の形態変化
3. 学会等名 第40回神経科学学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 聡 (Sakamoto Satoshi) (30419270)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	
研究分担者	井上 由理子 (Inoue Yuriko) (50509958)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------