

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09310

研究課題名(和文) 漢方薬は慢性腎臓病の治療薬となり得るか? : 漢方薬の炎症制御機構解明へのチャレンジ

研究課題名(英文) Can Kampo Medicines treat chronic kidney disease? : Challenge to elucidate the inflammation control mechanism of traditional herbal medicine

研究代表者

大山 陽子(OYAMA, Yoko)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：20583470

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) : 核蛋白HMGB1は細胞外ではサイトカイン能をもち、3つのシステイン残基の酸化、還元により細胞遊走能や炎症性サイトカイン産生能など働きを変換することも分かってきた。漢方薬のHMGB1酸化還元調節による腎炎への影響を調べるにあたり、酸化還元状態の検出法として質量分析法による検出の確立を目指した。部分酸化型HMGB1を元に還元・酸化型HMGB1の調製を行った。事前にシステイン残基に修飾をする工夫を行った結果、質量分析法での3型の検出が可能となった。生体試料からの抽出も考え、免疫沈降法でも検討を行ったところ、濃度依存性も含め検出が可能であり、直接法、免疫沈降法双方の3型HMGB1の検出法が確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1は自身の酸化、還元状態が変化することにより、それぞれ異なったサイトカインの働きを持つことが分かっている。HMGB1の酸化還元の調節による炎症制御機構を明らかにすることは、HMGB1の関与が明らかとなっている腎炎の新たな治療法の提唱となる。

研究成果の概要(英文) : Nuclear protein HMGB1 has a cytokine activity extracellularly and changes functions such as cell migration and inflammatory cytokine production activity by changing redox states of three cysteine residues. In investigating the effects of Chinese herbal medicines on HMGB1 redox regulation on nephritis, we aimed to establish a detection method by mass spectrometry for detecting each redox state of HMGB1. Reduced HMGB1 and oxidized HMGB1 were prepared based on disulfide HMGB1. Modifying the cysteine residues in advance, we succeeded to detect each type of HMGB1 by mass spectrometry. We also detected three types of HMGB1 in dose dependent manner using an immunoprecipitation method. We could confirm to detect for three types of HMGB1 using mass spectrometry by both the direct method and the immunoprecipitation method.

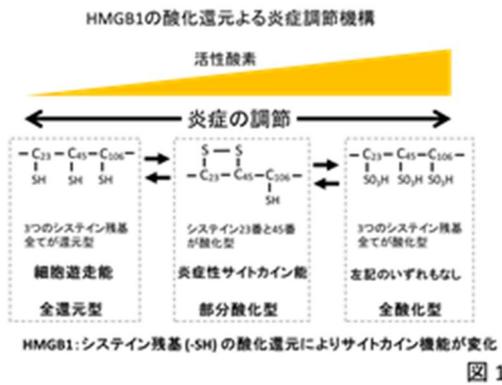
研究分野：医歯薬学

キーワード：HMGB1 腎炎 漢方薬 炎症制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

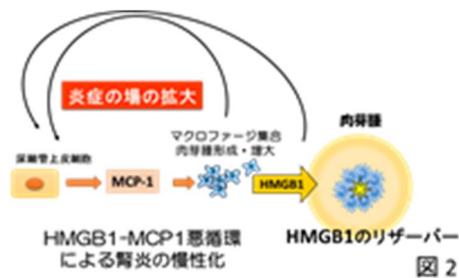
1. 研究開始当初の背景

1973年に核蛋白質として発見されたHMGB1(High mobility group box 1)は、DNAの立体構造維持などその核内での働きが知られていた。その後、細胞崩壊や白血球細胞からの分泌などにより細胞外へ遊離されたHMGB1は、炎症性サイトカインの産生や細胞遊走を促すなど全く新たな一面を持つことが分かり、再び脚光を浴びることになる。以後、我々を含む内外の研究から、細胞外でのHMGB1は幹細胞活性化および血管新生・増生の促進などから組織修復を促すなど生体に対してプラスに働く一方、



炎症細胞の局所浸潤の促進や、サイトカイン産生による炎症反応の増幅をおこし、さらにHMGB1の波及が全身化すると遠隔臓器にまでその炎症や凝固反応を惹起し、DIC/SIRS、多臓器不全などから組織障害に至り、最終的には死の原因となる事も報告されてきた。新たな知見として、HMGB1の複数ある炎症性サイトカインとしての機能は構成アミノ酸として3カ所あるシステイン残基それぞれの酸化・還元状態の違いによりその機能が変換されることが明らかとなりつつある。全

てが還元状態であると細胞遊走因子として、1カ所が酸化されると炎症性サイトカイン産生因子として、さらに3カ所とも酸化されるとそのいずれの機能も持たなくなるなど、自身の酸化還元状態を変化させることで働きをスイッチし炎症を調節しているのである(Nat Rev Rheumatol. 2012他)(図1)。我々は当時明らかとなっていなかったHMGB1と腎炎との関連について、肉芽腫形成腎炎モデルを用い検討を行った。結果、肉芽腫内のマクロファージより放出されたHMGB1が尿管上皮細胞を刺激することで単



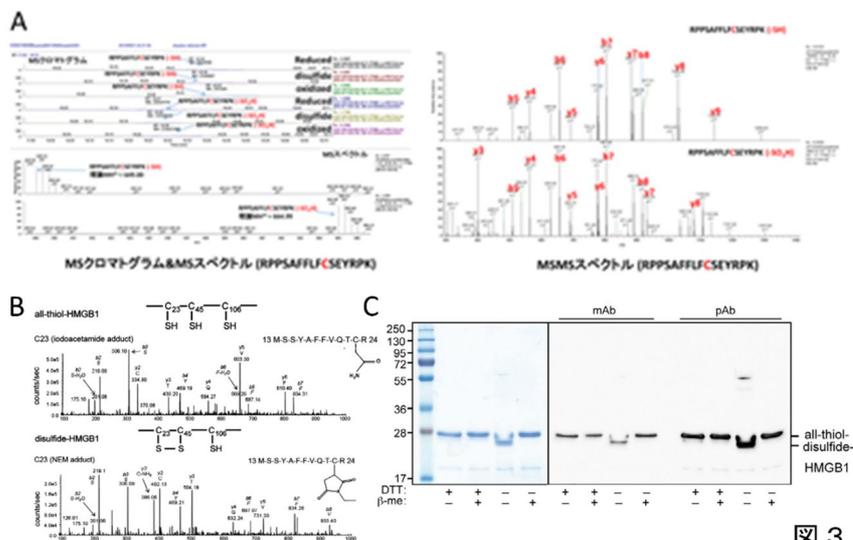
球遊走因子MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)を放出させ、そのMCP-1が局所にマクロファージを集めることでさらにHMGB1放出を引き起こすといったHMGB1-MCP-1による悪循環を軸に、HMGB1の腎内沈着が腎炎の進展、遷延化、さらに機能不全をきたすことを世界に先駆けて明らかにした(図2)。さらに我々は、Bianchiより譲与されたHMGB1遺伝子改変マウスを用い

て本腎炎モデルを作製したところ、ヘテロノックアウト(ホモノックアウトは致死)にて腎炎の有意な改善がみられた(Oyama Y et.al. Lab Invest. 2010)。これらの研究結果は、腎炎の起炎物質としてHMGB1が重要であるという端緒を拓いた。蓄積された多くの研究から、HMGB1により引き起こされる病態制御は当然のことながらHMGB1の抑制が治療の戦略であるとされていた。しかしながら、細胞内HMGB1の欠損にてかえって炎症が増悪し、予後を悪くするという驚くべき事実が近年複数報告されるようになってきている(Gastroenterology 2014他)。これら一連のHMGB1研究結果より、我々はHMGB1を押さえ込むことが必ずしも治療になるのではなく、状況に合わせてHMGB1の機能をコントロールすることが大切なのではないか?という考えに至った。HMGB1の酸化還元調節による炎症治療薬を考えた際、五苓散を候補に挙げた。理由として、腎炎モデルは多尿であったこと、また五苓散は腎疾患の代表的漢方薬であり、体液量により尿量を調節することが報告されていたからである。

2. 研究の目的

HMGB1に起因する腎臓の炎症コントロールとして、我々はHMGB1の酸化還元の調節にスポット当て、五苓散の腎炎治療薬としてのメカニズム解明をテーマに研究を行った。

### 3. 研究の方法



HMGB1に3カ所あるシステイン残基の酸化還元状態の解析はLC/MS/MS法を用い精密に確認を行った(図3)。加えて、電気泳動による手法も用いた。これはHMGB1の酸化・還元の状態の違いによって蛋白構造が変化し、ゲル内の移動度が変わることを利用して検出する

方法であり、既に確立された手法である(J Exp Med. 2012 12;209(3):551-63 他)(図3)。リコンビナントHMGB1に還元剤DTT(dithiothreitol)及び酸化剤H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加することで全還元型、部分酸化型、全酸化型HMGB1の3型を作成しそれぞれの型における五苓散の変換作用の確認を行った。さらに腎炎動物モデルに五苓散投与群を含め4群を作成、五苓散の腎炎へ及ぼす動態変化を病理学的、生化学的手法等を用い検討した。

### 4. 研究成果

= HMGB1酸化還元調節能の検証 =

HMGB1の酸化還元状態を検出する方法は、質量分析法のほか立体構造の変化による移動度の違いを利用して検出するウェスタンブロットング法がある。我々は3つの型をより高精度に検出できる質量分析による検出法の確立を目指し、検討を行った。サンプル抽出の際にHMGB1は酸化還元の影響を受けることが予想されたため、初めに質量分析法にて検出の精度を確認する作業を行った(図4)。調製の基本となる部分酸化型HMGB1の探索を終えたの

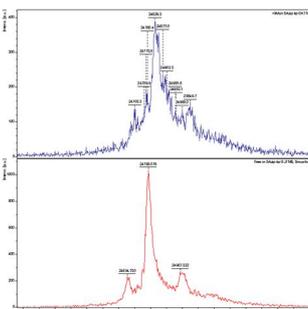


図4

ち、還元・部分酸化・酸化型それぞれのHMGB1を調製し、質量分析を行った。結果、調製サンプルは3つの型として検出可能であったが、電気泳動を介しゲル上から抽出した試料は酸化還元の修飾を受けていた。そこで、次の段階としてあらかじめシステイン残基にキャップを行い、一連の工程で酸化還元の影響を受けないような手法の確認、検討を行った。結果、3つの型の作成が不十分(過酸化水素、DTTのトリート不足)な場合があり、繰り返し検討を要したが、最終的に3つの型の検出が可能となった。さらに生体試料からの抽出を考え、直接アプライ法に加え、免疫沈降法での検討も行った。同時に濃度勾配による検出精度についても検討を行った。結果、濃度依存性の確認ができ、また直接法と同様にビーズ吸着法でも高精度にHMGB1の3つの型それぞれの検出が可能であることが確立できた(図5)。現在、五苓散トリートによるHMGB1の

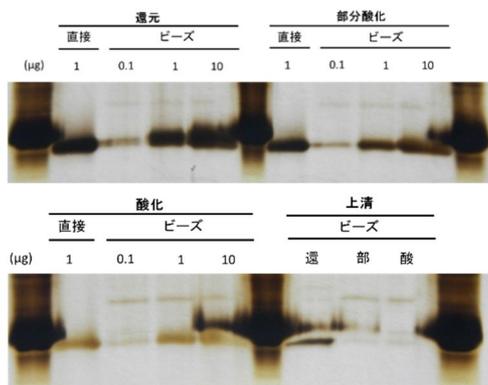


図5

五苓散トリートによるHMGB1の酸化還元状態の解析はLC/MS/MS法を用い精密に確認を行った(図3)。加えて、電気泳動による手法も用いた。これはHMGB1の酸化・還元の状態の違いによって蛋白構造が変化し、ゲル内の移動度が変わることを利用して検出する

型の変化について検討を行っている。さらに、腎炎ラットモデルを用いコントロール群、五苓散投与群、腎炎群、五苓散投与腎炎群の4群を作成し、血液、尿、腎組織を採取している(図6)。今後、我々が



検討を行った質量分析による酸化還元の検出法を用いて、五苓散投与による各試料の HMGB1 の型の変化について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Oyama Y, Tancharoen S, Ito T, Yamakuchi M, Higashi S, Hashiguchi T, Maruyama I.
2. 発表標題 Chinese herbal medicine "Wu Ling San" had a renal protecting function in crystal induced granulomatous nephritis in rats.
3. 学会等名 9th International Symposium DAMPS and HMGB1, Okayama, Japan 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019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	丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授  (17701)	
研究分担者	山口 宗一 (YAMAKUCHI Munekazu) (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	堂前 直 (DOMAE Naoshi) (00321787)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー  (82401)	