

様式 G-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590567

研究課題名 (和文) S100A8/A9・サイトカイン複合体による炎症性疾患診断システムの開発

研究課題名 (英文) Development of a new diagnostic system of inflammatory diseases by measuring S100A8/A9・cytokine complexes

研究代表者

池本 正生 (IKEMOTO MASAKI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80144385

研究成果の概要 (和文)：

ヒト S100A8/A9 が血清中でフィブロネクチンと非特異的に結合すること、また両者が単球及び好中球の細胞膜表面に存在すること、フィブロネクチンは骨髄系免疫細胞によって炎症組織に運搬される可能性の高いことが明らかになった。次に、S100A8 が LPS 誘導急性肝障害を軽減することが明らかになったことから、S100A8 が急性炎症に対する調節因子として機能している可能性を示した。一方、自己免疫性心筋炎モデルを用いて実験から、S100 タンパク質が活性化されたマクロファージの優れたマーカーであることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

We found that S100A8/A9 non-specifically bind with fibronectin (h-FN), and that both the two protein exist on surface membrane of neutrophils and monocytes. The h-FN could be conclusively transported with S100A8/A9 in blood and/or on immunological cells, and effectively prevent further attack by various internal oxidants or repair damaged liver tissue in vivo. When recombinant human S100A8 was intravenously injected in the rats with LPS-induced liver damage, not only expression of r-S100A9 but also the activities of AST, ALT and LD significantly went down in comparison with those of the rats with liver damage, strongly suggested that the r-S100A8 could serve as a regulator of acute inflammatory reaction in the rats with LPS-induced damage. Immunohistochemistry provided interesting microscopic images, in which much r-S100A8 and r-S100A9 were observed in many macrophages in the heart tissues of rats with experimental autoimmune myocarditis. In addition, macrophages were positive for not only CD68 antigen but also r-S100A8 and/or r-S100A9 proteins, strongly suggesting active condition of the macrophages in inflamed areas of the heart tissues with EAM. Therefore, r-S100A8 and r-S100A9 in macrophages should be novel indexes for active condition of the cells in the EAM rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	0	0	0
2012年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床生化学、臨床化学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：S100 蛋白、マクロファージ、好中球、拒絶反応、急性炎症、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来の免疫細胞、すなわちマクロファージや好中球が移植後の拒絶反応に対する急性炎症の際、S100 タンパク質が著しく血中において上昇することを見出し、報告した。しかし、その S100 タンパク質がどのような目的で、どのような機能を担って分泌されるのか、あるいはどのような形状で存在しているのかはほとんど不明であった。S100 タンパク質は S100A8 と S100A9、及びこれらが会合した S100A8/A9 の存在は確認されているが、ホモダイマーである S100A8/A8 と S100A9/A9 の存在はいまだに確認されていない。一方、S100 タンパク質と血中のタンパク質成分との複合体、すなわち炎症性サイトカインとの複合体について、我々はその存在の可能性を報告してきた。このように、S100 タンパク質は血清中あるいは血漿中の成分と複合体を形成することにより、生体内の恒常性の維持、とくに急性炎症における炎症反応の制御など、何らかの機能的役割を果たしている可能性が強く示唆される。このように、S100 タンパク質と複合体が形成されることは、免疫学的にも注目される。また、S100 タンパク質が骨髄系免疫細胞に強く発現することを考えると、複合体形成は免疫学的な意義を有する可能性がある。とくに、急性炎症期に著しく血中において増加することから、急性炎症を伴う炎症性疾患や拒絶反応に伴う急性炎症に深く関連する可能性が予想される。従って、各炎症性の早期発見あるいは経過と予後の監視において、S100 タンパク質との複合体が新しいバイオマーカーとなりうる可能性がある。

2. 研究の目的

S100 タンパク質、特に S100A8/A9 に結合する血中成分を同定し、その生理的、免疫学的意義について考察すること、また、モノマーであるラット S100A8 及び S100A9 に対するモノクローナル抗体を作製し、これらの細胞生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) アフィニティークロマトグラフィー
- 2) SDS-PAGE
- 3) Western blotting
- 4) ゲル濾過法
- 5) 質量分析法
- 6) 酵素免疫測定法 (ELISA)
- 7) 免疫染色及び蛍光免疫染色
- 8) DHE 染色
- 9) Flow cytometry

4. 研究成果

1) S100A8/A9 結合タンパク質の分離・精製及び機能的役割について

S100A8/A9 結合 Sepharose 4Bアフィニティークラムを用いて、S100A8/A9 に結合する血中タンパク質成分の分離・精製を試みたところ、複数のタンパク質成分を分離することができた (Fig. 1)。

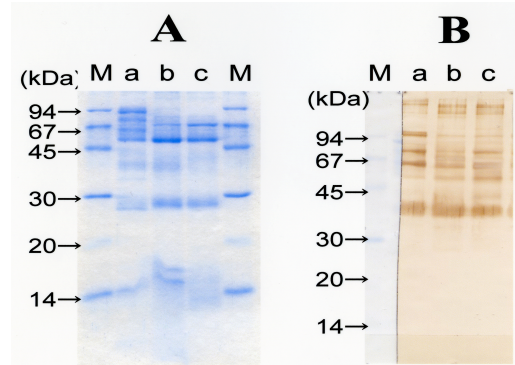


Fig. 1. Isolation of serum constituents binding with *r-S100A8/A9* from human sera of patients

In A, SDS-PAGE for serum constituents binding with *r-S100A8/A9* was carried out in the presence of 2-ME. Lane M shows molecular mass markers. Lanes 1, 2 and 3 show protein bands of the serum constituents eluted from *r-S100A8*-, *r-S100A9*- and *r-S100A8/A9*-Sepharose 4B affinity columns, respectively. In B, anti-serum constituents antibodies preliminary raised in rabbits and anti-rabbit IgG (goat) IgG-HRP were used as the first and second antibodies, respectively. Loaded samples of lanes a, b and c in panel A correspond to those in panel B, respectively.

その成分を質量分析法で同定したところ、フィブロネクチンとも結合することが判明した。そこで、我々はフィブロネクチンに対するモノクローナル抗体を作製し、血中における変動を明らかにするため、ELISA を構築した。その結果、フィブロネクチンを定量的に測定することが可能となった (Fig. 2)。

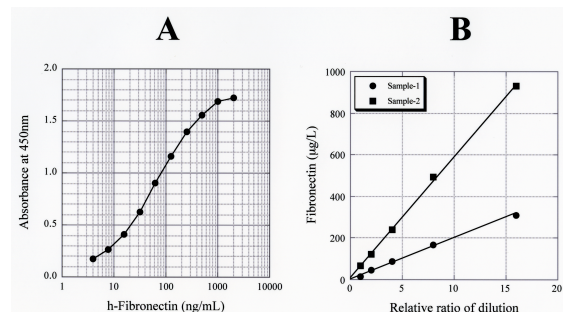


Fig. 2. Linearity and sensitivity of the ELISA for h-FN, and its precision and recovery

In A, h-FN (BD Biosciences Co. Ltd.) was used as the standard. In B, two pooled sera with different concentrations (low and high) were used to confirm the linearity of the ELISA.

一般に、フィブロンネクチンは炎症の修復あるいはさらなる侵襲を防御することが示唆されているが、S100A8/A9 がこのフィブロンネクチンと結合し、炎症部位に輸送するキャリアタンパク質としても機能する可能性が強く示唆されたことである。したがって、血中においてフィブロンネクチンは障害の修復に使用されるため、炎症とともに減少する。逆に、CRP 及び S100A8/A9 は上昇する傾向を示した (Fig. 3)。

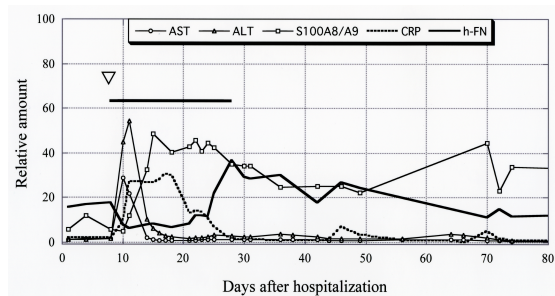


Fig. 3. Changes in h-FN, h-S100A8/A9, CRP and other laboratory markers in serum of a liver recipient

Liver transplantation was performed for hepatocellular carcinoma associated with liver cirrhosis (c-type). Concentrations of h-S100A8/A9 and h-FN were measured by the ELISA methods for each protein, respectively. Other laboratory markers were measured using an automatic chemical analyzer (TBA200FR-Neo; TOSHIBA, Tokyo). The day of surgery is indicated by a vertical open triangle. Values are presented as the relative ratio to the upper value of the normal range of each marker.

このように、CRP だけでなく、フィブロンネクチン及び S100A8/A9 を同時に測定することにより、より正確に移植後の拒絶反応に伴う急性炎症を監視することが可能である。

Table 1
Identification of PXs by mass spectrometry

	Proteins identified
P1	IgM chain C region
P2	Serum albumin
P3	Plasminogen
P4	Plasminogen
P5	Plasminogen and Fibrinogen beta chain
P6	Plasminogen
P7	Plasminogen and Fibulin-1
P8	Serum albumin
P9	IgM chain C region and Antithrombin-III
P10	Fibronectin
P11	Immunoglobulin light chain
P12	Immunoglobulin light chain
P13	Antithrombin-III/IGHA1 ^a and Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
P14	Fibronectin

a: Ig alpha-1 chain C region

一方、S100A8/A9 と結合するタンパク質成分はフィブロンネクチン、プラスミノゲン、アンチトロンビンIIIなどであった。注目されたのは、凝固止血系の因子と結合することであった。したがって、S100A8/A9 は移植後に起こるとされているDICの発症に関係している可能性が示唆された (Table 1)。

以上から、移植後の監視において、CRP だけでなく S100A8/A9、フィブロンネクチンも有用なバイオマーカーであることが明らかとなった。

2) S100A8 及び S100A9 の細胞内局在とその分布、及び S100A8 の炎症抑制効果について

S100A8/A9 の生理的、機能的意義に関しては多数の報告がある。しかし、S100A8 及び S100A9 の機能的役割が十分解明されるには至っていない。そこで、我々は動物実験を通して検証することを試みた。すなわち、ラットの S100A8 及び S100A9 に対するモノクローナル抗体を作製し、S100A8 及び S100A9 の細胞内局在及び細胞外への分泌に関する検討を in vivo 及び in vitro の系で実施した。その結果、ラット S100A8 及び S100A9 に特異的なモノクローナル抗体の作製に成功した。そこで、まずラット S100A9 に対する ELISA の開発を試みた。その結果、精度のよい SELISA を構築することに成功した (Fig. 4)。

次に、LPS で誘導した急性肝障害モデルラットにヒトリコンビナント S100A8 を血管内に投与し、作製した S100A8 及び S100A9 に対するモノクローナル抗体を用いて炎症抑制効果があるかどうかを組織学的、生化学的に検討したところ、組織学的には炎症反応、及び S100 タンパク質陽性免疫細胞が数及び量ともに有意に減少することを明らかにした。また、組織学的に、肝組織の炎症部位に集積している免疫細胞は CD68 に強い陽性反応を示したことから、その大半はマクロファージであることが判明した。したがって、ヒト S100A8 はマクロファージに作用し、免疫抑制効果を発揮している可能性が示唆された。

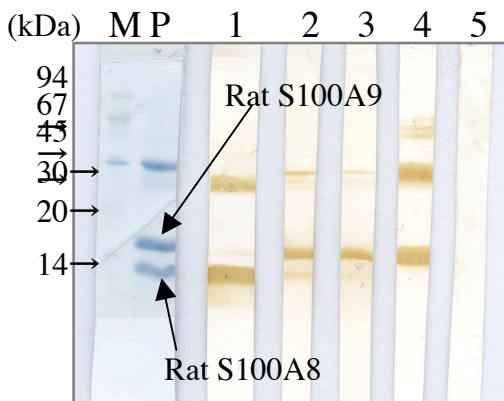


Fig. 4 Specificity of monoclonal antibodies for rat S100 proteins and development of an enzyme-linked immunosorbent assay.

In A, lane M shows molecular mass markers. Lane P shows protein bands of the mixture of rr-S100A8 and rr-S100A9. Lanes 1 to 5 contains the same proteins as lane P (100 µg/lane). Anti-r-S100A8 antibody (mAb2H6) was used as the first antibody (lane 1). Anti-r-S100A9 antibodies (mAb1d11, mAb10D11 and mAb15E9) were used as the first antibody (lanes 2-4). Anti-mouse IgG (horse) IgG-HRP conjugate was used as the second antibody (lanes 1-4). In B, a polycarbonate ELISA plate preliminarily coated with rat S100 proteins partially purified from rat leukocytes was used. In contrast, an ELISA plate with no antigen was used as a negative control. Each monoclonal antibody was detected with anti-mouse IgG (horse) IgG-HRP conjugate. In C and D, an ELISA plate preliminarily coated with mAb1D11 (5 µg/ml) was used. In D, two pooled sera with different concentrations (low and high) were used to confirm the linearity of the ELISA.

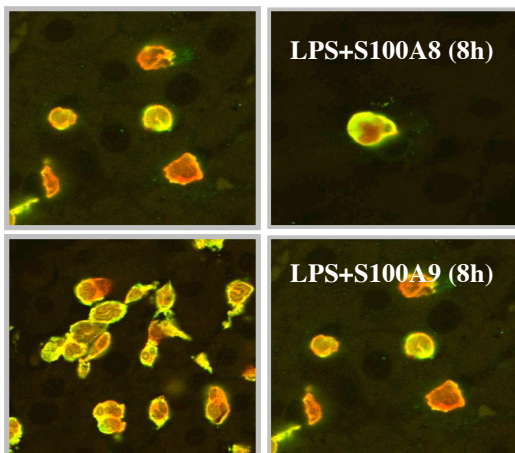


Fig. 5. Intracellular localizations of endogenous S100A8 and/or S100A9 in the immune cells in the rats with LPS-induced damage. A gr: panels A1-A4, B gr: panels B1-B4, C gr: C1-C4, D gr: panels D1-D7. Panels D5-D7: nuclei were stained with DAPI. In panel D1, two groups of immune cells in the center and around inflamed areas of the liver tissues are indicated by two white circles and horizontal arrows, respectively. Color of microscopic images: red, r-S100A8; green, r-S100A9; yellow, merge; blue, nuclei. A1, B1, C1 and D1: low power field (×100). A2, B2, C2 and D2: high power field (×600). A3, A4, B3, B4, C3, C4 and D3 to D7: super high power field (×4000).

また、S100A8 及び S100A9 の免疫細胞内における局在性について検討したところ、S100A8 は細胞室内に、S100A9 は細胞膜周辺に局在する傾向が観察された (Fig. 5)。さらに、一般的な炎症マーカーである AST, ALT, LD 活性が有意に低下したことから、S100A8 が LPS 誘導急性肝障害を間接的に抑制する可能性を明らかにした (Table 2)。しかし、こ

のような抑制効果がどのような機序によって行われているかは今後の課題である。

3) 自己免疫性心筋炎モデルラットにおける免疫細胞の役割と S100 タンパク質の機能的役割について

自己免疫性心筋炎モデルラット (EAM) において、S100 タンパク質、とくに S100A8/A9 が炎症の助長あるいは抑制に深く関わっていることを寺崎らが報告した。しかし、S100A8 及び S100A9 が S100A8/A9 と強調して作用するのか、あるいは単独で免疫学的な機能を発揮しているのか、ほとんど明らかになっていない。そこで、ラット S100A8 及び S100A9 に対するモノクローナル抗体を用いて、EAM を発症したラット心筋組織における免疫細胞、とくにマクロファージの S100A8 及び S100A9 の細胞内局在性とその分布を観察し、S100 タンパク質の機能的役割に関する検討を試みた。

その結果、ブタミオシンで免疫してから 14 日目には軽度、21 日目には明らかに心筋炎が誘導されていることが確認できた。炎症を伴う心筋組織には免疫細胞、とくにマクロファージが集積する様子が明確に示され、そのマクロファージには S100A8 が優位に発現していることが明らかになった (Fig. 6)。

しかし、EAM モデルにおいて、S100A8 が炎症抑制的に作用しているのか、あるいはその反対であるのか、また、どのような作用機序で S100 タンパク質が誘導されるのかは依然として不明である。そこで、21 日目におけるマクロファージ内の NF-κB を酵素抗体法により検出したところ、核内において強い陽性反応が確認できたことから、TLR4 レセプターを介した炎症反応に対する情報伝達経路による活性化と深く関係している可能性が示唆された。

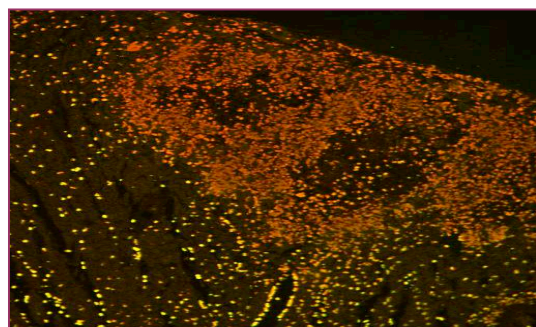


Fig. 6. Infiltration of macrophages expressing endogenous S100A8 and S100A9 in the cardiac tissue of rats with EAM

r-S100A8 (Red) and r-S100A9 (Green) were immunohistochemically stained using mAb2H6-biotin plus STA-TexasRed and mAb15E9 plus anti-mouse IgG (horse) IgG-FITC, respectively. Magnification of light microscopy: low power field (×100)

そこで、ラットからマクロファージを単離し、LPS で刺激することにより、マクロファージ内の S100 タンパク質がどのように活性化されどのような細胞内局在を示すか、あるいはどのような分泌機能を示すかについて検討した。その結果、活性化前は S100 タンパク質がマクロファージ内の一部に集積する傾向にあったが、刺激後はその集積場所から細胞膜周辺に移動し、さらに細胞外に分泌されることを初めて明らかにした (Fig. 7)。

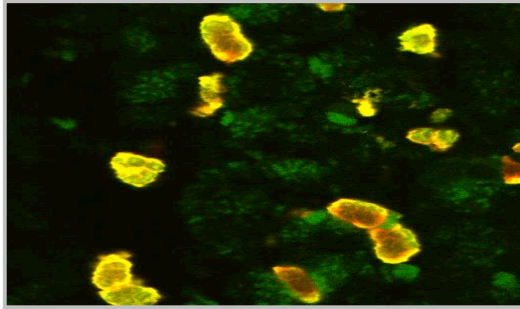


Fig. 7. Infiltration of macrophages expressing endogenous S100A8 and S100A9 in the cardiac tissue of rats with EAM

Fluorescent immunological staining of CD68 and r-S100A8 was carried out. Magnification of light microscopy: super high power field ($\times 2500$).

以上から、S100 タンパク質は TLR4 の情報伝達経路を介して、その発現と分泌が制御されている可能性が強く示唆された。今後、免疫細胞、とくにマクロファージからの S100 タンパク質 (S100A8, S100A9 及び S100A8/A9) の分泌機構の解明が急性炎症に対する S100 タンパク質の本質的な機能的役割の解明に繋がると考えられた。

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 9 件)

- ① Koike A, Arai S, Yamada S, Nagae A, Saita N, Itoh H, Uemoto S, Totani M, Ikemoto M. Dynamic mobility of immunological cells expressing S100A8 and S100A9 in vivo: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation*, 査読有, 2011, in press
- ② Li-Ping Ma, Espen Haugen Masaki Ikemoto, Masatoshi Fujita, Fumio Terasaki, Michael Fu, S100A8/A9 complex as a new biomarker in prediction of mortality in elderly patients with severe heart failure. *Int J Cardiol*, 査読有, 2011, in press.
- ③ Namura T, Arai S, Okawa K, Koike A, Yamada S,

Saita N, Nagae A, Itoh H, Totani M, Uemoto S, Ikemoto M. Identification of serum proteins that bind with S100A8, S100A9 and S100A8/A9: clinical significance of using proteins for monitoring the postoperative condition of liver recipients. *Clin Chim Acta*, 査読有, Vol.411, 2010, pp.1766-1773

- ④ Namura T, Arai S, Koike A, Yamada S, Totani M, Ikemoto M. Possible mechanism for regulation of inflammatory responses with the S100A8/A9 protein. *Rinsho Byori*, 査読有, Vol.58, 2010, pp.651-657.
 - ⑤ Katashima T, Naruko T, Terasaki F, Fujita M, Otsuka K, Murakami S, Sato S, Hiroe M, Ikura Y, Ueda M, Ikemoto M, Kitaura Y. Enhanced Expression of the S100A8/A9 Complex in Acute Myocardial Infarction Patients. *Circ J*, 査読有, Vol.74, 2010, pp.741-748.
 - ⑥ Otsuka K, Terasaki F, Ikemoto M, Fujita M, Tsukada B, Takashima T, Kanzaki Y, Sohmiya K, Kono T, Toko H, Fujita M, Kitaura Y I. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network. *Eur J of Heart Failure*, 査読有, Vol.10, 2009, pp.1093-1101.
 - ⑦ Ishihara K, Namura T, Murayama H, Arai S, Totani M, Ikemoto M. Possibility of formation of the S100A8/A9 proinflammatory cytokine complexes in vivo in acute inflammation and their functional roles. *Rinsho Byori*, 査読有, Vol.57, 2009, pp.324-331.
 - ⑧ Miyamoto S, Ikemoto M, Naruko T, Itoh A, Tamaki S, Nohara R, Terasaki F, Sasayama S, Fujita M. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina. *Heart*, 査読有, Vol.94, 2008, pp.1002-1007.
 - ⑨ Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Nagata A. Superiority of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the detection of toxicant-induced acute hepatic injury in rats. *Clin Chim Acta*, 査読有, Vol.391, 2008, pp.31-35.
- [学会発表] (計 4 件)
- ① 小池阿木子, 山田幸子, 南村知代, 荒井 智、齋田尚子, 永江亜紀子, 戸谷誠之, 池本正生, S100A8 と S100A9 による炎症反応調節機構及び臨床的意義について、第 57 回臨床検査医学会学術集会 (東京) (平成 22 年 9 月 11 日)

- ②山田幸子, 小池阿木子, 南村知代, 荒井 智、齋田尚子, 永江亜紀子, 戸谷誠之, 池本正生、S100 タンパク質に結合する血清中タンパク質の同定 –肝移植後の監視における臨床的意義について–、第 57 回臨床検査医学会学術集会 (東京) (平成 22 年 9 月 10 日)
- ③南村知代, 山田幸子, 小池阿木子, 荒井 智, 戸谷誠之, 池本正生、S100A8/A9 による炎症反応調節機構及びその臨床的意義について、第 56 回臨床検査医学会学術集会 (平成 21 年 8 月 27 日) (札幌)
- ④石原佳依, 南村知代, 村山 寛, 戸谷誠之, 池本正生、S100A8/A9・炎症性サイトカイン複合体の新しいバイオマーカーとしての臨床的意義について、第 48 回日本臨床化学会年次学術集会 (静岡) (平成 20 年 8 月 30 日)

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
池本 正生 (IKEMOTO MASAKI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：8 0 1 4 4 3 8 5
- (2) 研究分担者
上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：4 0 2 5 2 4 4 9
- (3) 研究分担者
江川 裕人 (EGAWA HARUTO)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：4 0 2 9 3 8 6 5
- (3) 連携研究者
該当者なし

Table 2. Changes in the levels of r-S100A9 in the serum and liver of rats with LPS-induced damage

Markers	S100A9		AST	ALT	LDH
	Serum	Liver			
Treatment (n=6)				Serum	
NC (No treatment)	1	1	1.0	1.0	1.0
A gr (LPS alone)	125±18.8 ^{a,h,i}	290±52.2 ^{b,e,j}	2.3±0.18 ^d	3.1±0.22 ^c	9.3±1.3 ^{f,g}
B gr (LPS+S100A8 [¶])	55±6.2 ^a	128±16.6 ^b	1.7±0.17 ^d	2.0±0.19 ^c	6.4±0.71 ^f
C gr (LPS+S100A9 [¶])	110±13.2	180±23.0 ^c	2.4±0.26	3.4±0.39	71±10.7 ^g
G gr (rh-S100A8 [¶] alone)	15.4±2.1 ^h	66.6±10.1 ^j	-	-	-
H gr (rh-S100A9 [¶] alone)	10.3±1.3 ⁱ	-	-	-	-

¶: rh-S100A8 or rh-S100A9 was intravenously administrated into the tail vein of the rat with and without LPS-induced liver damage. Values are the mean ± 1SD of relative concentrations of r-S100A9 against those (mean of triplicate determinations) of negative control rats (NC), respectively, 8 h after injection of LPS. Within-day variation (coefficient of variation, C.V.) in ELISA for r-S100A9 was less than 7%. a, b, d, e, f: p < 0.01, c, g, h, i, j: p < 0.001, gr: group.