

平成 22 年 5 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790575

研究課題名 (和文) 網羅的代謝解析を用いた白血球による COPD 発症機構の解明

研究課題名 (英文) The Metabolome Analysis: Association with pathogenesis of COPD in Leukocyte

研究代表者 高宮 里奈 (TAKAMIYA RINA)

大阪大学 医学系研究科 特任研究員 (常勤)

研究者番号：70365419

研究成果の概要：

申請者は、キャピラリー電気泳動-質量分析装置を用いたメタボローム解析より、タバコ煙抽出液は、細胞内糖代謝流速を解糖系からペントースリン酸回路にシフトさせ、ヌクレオチド生成も亢進させ、細胞内糖代謝応答に異常を引き起こす事で、白血球の機能や生存を制御している可能性が示唆する可能性を示した。そのため、この回路の異常が白血球の機能異常を齎し、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の病態修飾に寄与すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：COPD、白血球、赤血球、メタボローム解析、活性酸素、ペントースリン酸回路

1. 研究開始当初の背景

急激な増加の一途をたどる慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に対する治療の開発は急務な課題である。COPD の主たる原因は喫煙であり、これによる白血球の集積や機能異常が COPD の病態を進行させることが示唆されている。近年、酸化ストレスやマクロファージや好中球から放出されるサイトカインやプロテアーゼが、COPD の発症に関わっていることが示唆されているが、タバコ成分が白血球機能のメカニズムにどのように影響しているかという事は分かっていない。

最近、糖代謝のバランスが、白血球の生存や活性化を制御することが示唆されてきている。

これは、 O_2^- の産生が分子状酵素とペントースリン酸回路から生成される還元当量としての NADPH を必要とする事を考えると、この経路の異常が白血球機能に影響を与える可能性は大きい。

またこれまで、申請者は、タバコ煙成分の一つであるアクロレインが、シクロオキシゲナーゼ-2 の発現を誘導し、動脈硬化の発症の一因になる可能性を報告した (Park YS, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。また新規測定法であるキャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いたメタボローム解析を行なった結果、タバコ煙の成分の一

つであるアクロレインはNADPH産生の上昇やグルタチオンの低下を起し、また代謝酵素であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素などを酸化修飾し、酸化ストレスが起している可能性を示唆するデータを得ていた。

2. 研究の目的

COPDの主たる原因は喫煙であり、これによる白血球の異常がCOPDの病態を進行させることが示唆されている。しかしながら、タバコ煙成分が白血球系細胞の機能変化のメカニズムにどのように関与しているかという詳細は分かっていない。近年、解糖系-ペントースリン酸回路-グルタチオン代謝のバランスが、白血球の生存や、活性化を制御することが示唆されている。これは白血球における O_2 の産生が分子状酵素とペントースリン酸回路から生成される還元当量としてのNADPHを必要とする事を考えると、この経路の異常が白血球の機能に影響を与える可能性は大きいと考えられる。

そこで今回申請者は、タバコで誘発される白血球機能異常にペントースリン酸回路、及びグルタチオン代謝バランス制御の変化が関与しているか否かを検討する。特に、NADPH生成を介した酸化ストレスがCOPDにおける白血球機能変化に影響していると想定して、この経路を重点的に解析する。具体的には、タバコ主成分中で、ジカルボニル化合物であるアクロレインが、白血球内代謝・機能に対する影響を詳細に検討し、COPDモデル動物および患者や白血球の解析と比較検討を行ない、COPDによる白血球細胞機能異常のメカニズムを代謝の面から明らかにして、その治療標的を探索する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アクロレインを添加した赤血球の機能解析

- ① アクロレインの赤血球膜上Band 3への影響
Band3に特異的に反応する事が報告されているeosin-5-maleimide(EMA)を用いた赤血球膜上Band 3へのアクロレインの影響をFACSにより検討を行った。
- ② アクロレインによるヘモグロビンのメト化についての検討
赤血球にアクロレインを添加後、分光光度計を用いて、ヘモグロビンのメト化の測定を行なった。

(2) アクロレインを添加した健常者(非喫煙者)好中球を用いたキャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-MS)によるメタボローム解析

タバコ抽出液、アクロレインを添加した好中球を用いて、新規測定法であるCE-MSを用いたメタボローム解析を行なった。

(3) タバコ煙抽出液及び、アクロレインを添加したマクロファージ細胞株(RAW264.7)の機能解析

- ① 細胞骨格
ファロイジンによるアクチン染色を行なった。
- ② 貪食能
RAW264.7細胞にタバコ煙抽出液および、アクロレイン添加後、蛍光標識した大腸菌を添加し、貪食能を観察した。
- ③ 酸化ストレス(活性酸素測定)
RAW264.7細胞にタバコ煙抽出液もしくは、アクロレインを添加後、 $H_2DCF-DA$ probeを用いて活性酸素種の測定を行なった。
- ④ 細胞内シグナル伝達経路の検討
タバコ煙抽出液を添加したRAW264.7細胞内のシグナル伝達を各種リン酸化抗体(抗pAkt, pSrc, pNF-kB抗体)によりウェスタンブロットにて検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、ヒト白血球、及び、ヒト赤血球を用いたタバコ煙抽出液やタバコ煙成分の一つであるアクロレインにより赤血球、白血球内代謝に影響をうけるかという事を中心に検討を進めていった。また、マウスマクロファージ細胞株(RAW 264.7細胞)を用い、タバコ煙抽出液やアクロレインが、どのように白血球機能に影響を及ぼすかという事についても検討を行った。

(1) アクロレインを添加した赤血球の機能解析

- ① アクロレイン(100nM~10 μ M)を添加し30分、37 $^{\circ}$ Cで反応させた赤血球は、代謝バランスが、ペントースリン酸回路系に傾いていた。
- ② Band 3への影響をみるためEMAを用いた検討を行なったところ、アクロレイン(10 μ M)添加後の赤血球では、EMAとの反応性が亢進していた。
- ③ アクロレイン(100 μ M)を曝露した赤血球では通常の赤血球に比べ、メト化の亢進も認められた(図1)。

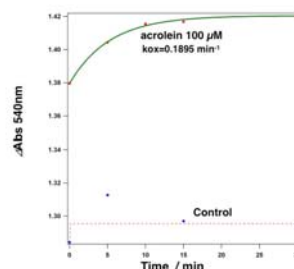


図1 アクロレインによるメト化の亢進

以上の結果より、Band 3の変化に伴った赤血球細胞膜の異常や細胞内代謝異常によるレドックスバランスの崩壊が起こっていると考えられ、その結果としてヘモグロビンのメト化の亢進がおきている可能性がある示唆された。

(2) アクロレインを添加した健常者好中球を用いたCE-MSによるメタボローム解析
 アクロレイン (10 μ M) を添加したヒト白血球では、赤血球と同様にペントースリン酸回路の亢進が認められ、一方で解糖系の代謝流速に低下が認められた。これは、先に報告した赤血球にアクロレインを添加した際とほぼ同じ結果であった。

(3) タバコ煙抽出液 (10%) 及び、アクロレイン (10 μ M) を添加したマクロファージ細胞株 (RAW264.7) の機能解析

① 細胞骨格

タバコ煙抽出液 (10%) や、アクロレインを添加したRAW264.7細胞は、ファロイジンによるアクチン染色の結果、細胞突起が短くなり縮小している細胞が多数認められた (図2)。

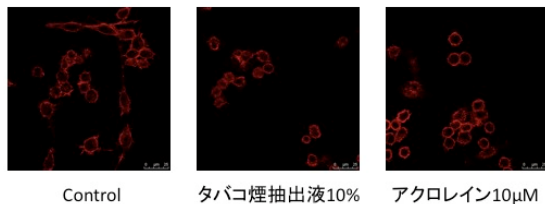


図2 タバコ煙抽出液、アクロレインによる細胞骨格変化 (ファロイジン染色)

② 貪食能

タバコ煙抽出液および、アクロレインで30分処理したRAW264.7細胞にFITC標識した大腸菌を添加し2時間後、蛍光プレートリーダーにより測定を行った。その結果、RAW264.7細胞は、タバコ煙抽出液では、50%、アクロレインでは80%まで、貪食能が低下していた。

③ 活性酸素産生

メタボローム解析より、タバコ煙抽出液やアクロレインには、細胞内代謝流速を解糖系からペントースリン酸回路にシフトさせ、ヌクレオチド生成も亢進させていた。またNADPH産生の上昇やグルタチオンの低下が認められた。さらに、NADPHオキシダーゼの複合酵素系の一つであるp47-phoxの局在部位の検討を行ったところ、CSEの添加によりp47-phox

の膜への移行の亢進が認められた。またH₂DCF-DA probeを用いた細胞内過酸化物の測定を行なった結果、細胞内の活性酸素種の亢進も認められた。

④ 細胞内シグナル伝達経路の検討
 細胞内シグナル伝達の検討をウェスタンブロットにより検討を行ったところ、タバコ抽出液の添加により、Akt、Src、NF- κ Bのリン酸化の亢進が認められた。そのため、タバコ抽出液は、Akt、Src、NF- κ Bなどの細胞内シグナル伝達経路を活性化させ、細胞内の生死、サイトカイン産生等に関わっている可能性が示唆された。

以上の結果より、タバコ煙抽出液やアクロレインは、細胞内レドックスバランスを崩壊させ、細胞内シグナルを活性化させ、白血球の機能や生存を制御している可能性が示唆された。

また細胞内fluxのペントースリン酸回路へのシフトにより生じるヌクレオチド生成の亢進から、糖ヌクレオチド、糖タンパク質、糖鎖生成に着目した。その結果、RAW264.7細胞を用いた糖ヌクレオチドの解析の行った結果、タバコ煙抽出液やアクロレインの添加により、糖ヌクレオチドの産生の亢進が認められた。

今後、糖代謝調節解析に基づき、糖代謝から糖タンパク質合成まで統合的にCOPDの病因解析を行なう予定である。

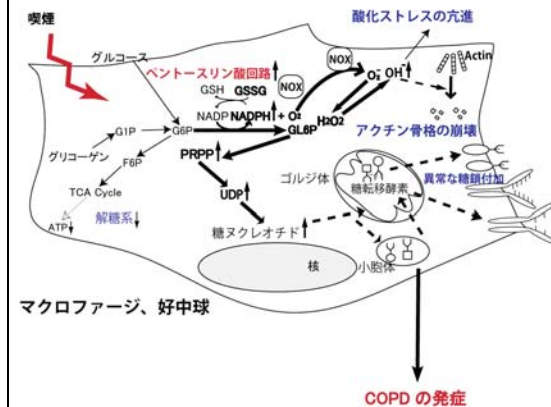


図3 タバコ煙による白血球内代謝調節と細胞機能制御

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 4 件)

- ① Hiroyuki Seki, Koichi Fukunaga, Arita, Makoto H, iroyuki Arai, Hiroki Nakanish, Ryo Taguchi, Toru Miyasho,

Rina Takamiya, Koichiro Asano, Akitochi Ishizaka, Jyunzo Takeda, Bruce D Levy
The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury
The Journal of Immunology, 184, 836-843, 2010, 査読有り

② Yoshito Iuchi, Futoshi Okada, Rina Takamiya, Noriko Kibe, Satoshi Tsunoda, Osamu Nakajima, Kazuyo Toyoda, Ritsuko Nagae, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, Koji Uchida, Jyunichi Fujii
Rescue of anaemia and autoimmune responses in SOD1-deficient mice by transgenic expression of human SOD1 in erythrocytes
Biochemical Journal, 422, 313-320, 2009, 査読有り

③ Rina Takamiya, Chi-Chih Hung, Sean R. Hall, Koichi Fukunaga, Takashi Nagaishi, Toshitaka Maeno, Caroline Owen, Alvaro A. Macias, Laura E. Fredenburgh, Akitoshi Ishizaka, Richard S. Blumberg, Rebecca M. Baron, Mark A. Perrella
High-mobility group box 1 contributes to lethality of endotoxemia in heme oxygenase-1-deficient mice.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 41, 129-135, 2009, 査読有り

④ Rina Takamiya, Rebecca M. Baron, Shaw-Fang Yet, Matthew D. Layne, Mark A. Perrella
High mobility group A1 protein mediates human nitric oxide synthase 2 gene expression.
FEBS Letters, 582, 810-814, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 5件)

- ① Rina Takamiya, Cigarette smoke extract induces bisecting-GlcNAc modification in RAW264.7 murine macrophage, 20th Joint Glycobiology Meeting, 平成21年11月9日-10日, ケルン、ドイツ
- ② Rina Takamiya, Cigarette smoke extract induces bisecting-GlcNAc modification in RAW264.7 murine macrophage, Japanese-Giessen GlycoWorkshop, 平成21年11月7日, ギーセン、ドイツ
- ③ 高宮里奈, タバコ煙によるマクロファ-

ジ機能低下におけるレゾルビン E1 の有用性、第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年 10 月 22 日、神戸

④ 高宮 里奈、網羅的代謝解析を中心としたアクロレインに曝露された赤血球の機能解明、第 31 回日本生化学会・分子生物学会合同大会、平成 20 年 12 月 11 日、神戸

⑤ Rina Takamiya, Circulating levels of HMGB1 are exaggerated in HO-1 null mice during endotoxemia, American Thoracic Society International Meeting 2008, 平成 20 年 5 月 19 日、トロント、カナダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 里奈 (TAKAMIYA RINA)
大阪大学 医学系研究科 特任研究員 (常勤)
研究者番号 : 70365419

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :