

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590542

研究課題名（和文）ネクローシス DNA 断片化と無菌的炎症

研究課題名（英文）NECROTIC DNA FRAGMENTATION AND ASEPTIC INFLAMMATION

研究代表者

水田 龍信（MIZUTA RYUSHIN）

東京理科大学・生命科学研究所

研究者番号：50297628

研究成果の概要（和文）：

細胞死に際して核内 DNA が断片化されることは知られているが、その生理的意義については不明であった。我々は細胞死 DNA 切断酵素遺伝子を欠損したマウスに薬剤で肝細胞死を誘導したところ、症状の増悪を認めた。その原因は死細胞除去が行われないことによる酸化ストレスの亢進にあるものと考えられた。つまり DNA 断片化の生理的意義は、速やかな死細胞除去と酸化ストレス抑制による生体恒常性の維持にあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The DNA fragmentation in cell death is a well-known phenomenon, but its physiological significance has insufficiently investigated. We found the aggravated drug-induced liver injury in the mouse deleted one of the genes of DNA fragmentation proteins. The aggravation is due to the increase of oxidative stress. Thus, the DNA fragmentation in cell death is essential for scavenging dead cells and maintaining homeostasis by reducing oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：ネクローシス・DNA 断片化・無菌的炎症・酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで DNase I ファミリーに属するエンドヌクレアーゼである DNase の機能や生体内における役割について研究してきた。このファミリーのエンドヌクレアーゼはすべてシグナルペプチドを有する分泌蛋白であるが、DNase は核移行シグナルも有しており、核内の染色体 DNA をリンカーヒス

トン H1 依存的にヌクレオソーム単位で断片化することができる（Mizuta et al. BBRC 345:560, 2006）。DNase は肝臓、脾臓、リンパ節といった組織に多く発現し、細胞ではマクロファージや樹状細胞、活性化 B 細胞に発現が高い。われわれは DNase 欠損マウス（KO マウス）および DNase 強制発現細胞株等を用いた研究から、アポトーシスのみ

らずネクローシスに陥った細胞においてもヌクレオソーム単位の染色体 DNA 断片化が起こること、そして、ネクローシス細胞における DNA 断片形成に DNase が必要であることを見出した。さらに、生体内における肝細胞ネクローシス誘導系である解熱鎮痛剤アセトアミノフェンの大量投与を行うと、DNase 欠損マウスでは高い感受性を示し、野生型マウスに比べて極めて高度の肝障害を起こした。このマウスの肝臓では壊死が高度に進行しており、自然免疫細胞の浸潤や肝細胞の再生が遅れ、肝細胞の保護・再生に働くサイトカイン・ケモカイン (IL-6 等) の発現の低下が認められた。このことは、DNase による DNA 断片化が自然免疫応答および肝組織修復に関わっていることを示唆している。自然免疫は最近特に注目されている研究領域であり、精力的に研究が行われている。自然免疫応答は大別すると、侵入した病原体の成分、すなわち pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) に対する応答と、損傷した自己組織の成分、すなわち damage-associated molecular patterns (DAMPs) に対する応答が存在するとされている。PAMPs に関しては、これを認識する Toll 様受容体 (TLRs) やその他の受容体が次々に同定され、その作用機序が明らかにされているが、DAMPs に関してはいまだ全容の解明には至っていない。生体内におけるネクローシス誘導系であるアセトアミノフェンによる薬剤性肝障害誘導は DAMPs と自然免疫応答を研究する上で良いモデルシステムであると考えられる。

## 2. 研究の目的

ネクローシス DNA 断片化酵素 DNase の生体内における機能の解明を目指している。その一環として DNase 遺伝子欠損マウス (DNase KO マウス) でみられたアセトアミノフェン誘導性肝障害の病態と、そのメカニズムの追求を行った。この研究は前述のごとく自然免疫応答に関与するメカニズムの解明という点で興味ある研究テーマである。さらに、欧米ではアセトアミノフェン誘導性肝障害による死亡事故が毎年報告されていて、社会的見地からも重要な問題であると考えられる。

## 3. 研究の方法

薬剤性肝障害の誘導にはアセトアミノフェンを腹腔内投与し、経時的に生存率、血清 ALT 値、肝臓組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E 染色)、免疫染色による比較、肝組織からの RNA の抽出と定量 PCR による遺伝子発現の比較などを行った。また DNase を介する壊死免疫応答が、肝臓以外の組織損傷修復に関わっているかどうかを検討する

ためにストレプトゾトシンによる膵臓細胞死を誘導し、膵臓組織像の解析ならびに糖尿病発症への影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) DNase KO マウスにおけるアセトアミノフェン誘導性肝障害の表現型

*in vivo* におけるネクローシス誘導系である解熱鎮痛剤アセトアミノフェンの大量投与により肝細胞ネクローシスを誘導したところ、野生型マウスに比べ KO マウスでは感受性が亢進し、生存率は低下し、ALT 値も高かった。KO マウスでは肝臓全体にわたり広範囲にネクローシス領域が広がっていたが、ネクローシス細胞核の変性は軽微で、炎症細胞の浸潤、さらには肝細胞の再生も抑制されていた。このメカニズムとしては、DNA 断片化が抑制されることにより、ネクローシス細胞核からの何らかの DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules) 生成が阻害され、自然免疫系を中心とした生体防御反応が減弱し、最終的にアセトアミノフェンに対する抵抗性の低下につながっているものと予想された。この DAMPs 候補としてヌクレオソーム、HMGB1、SAP130 を想定し、検討を行った。その結果、少なくとも HMGB1、SAP130 に関しては DNase に依存しないでネクローシス細胞核から漏出することが明らかになった。またハイドロダイナミックインジェクション法で直接肝臓内に DNase 発現ベクターを導入すると KO マウスでもネクローシス細胞核の断片化が認められた。このことからネクローシス細胞核の断片化は DNase に依存することが明らかになった。

### (2) 酸化ストレスの関与

酸化ストレスによって誘導される酸化ストレス分子として活性酸素やヒドロキシラジカルが有名である。このほかに酸化ストレスにより脂質などから産生されるいくつかの不飽和アルデヒドが知られている。活性酸素と同様に、これらの不飽和アルデヒドも反応性が高く毒性も強い。生体内でのこれらの酸化ストレス関連分子の量を直接測定することは難しいが、間接的に測定する方法はいくつか開発されている。たとえば酸化ストレスの際に細胞内で誘導される蛋白質に Heme Oxygenase-1 (HO-1) がある。HO-1 は酸化ストレスによる遊離ヘムによって誘導され、酸化促進剤である遊離ヘムを除去するのみならず、これらの代謝産物の作用を介して細胞保護的に機能する。したがってこの HO-1 の発現を生体内酸化ストレスの指標とすることができる。本実験ではマウスにアセトアミノフェンを投与し、一定時間後に肝臓を採取した後、RNA を精製した。この RNA を用いて cDNA を作成し、定量 PCR により HO-1 の発現

を比較したところ、野生型マウスに比べ KO マウスでの発現が有意に高いことが判明した。また酸化ストレスの際に細胞内で生成される不飽和アルデヒドは反応性に富み、蛋白や核酸に結合し、構造を変化させることが知られている。生体内の不飽和アルデヒドそのものを測定することはできないが、不飽和アルデヒド付加物の量を測定することで生体内の酸化ストレス量を比較できる。これらの不飽和アルデヒドは蛋白質内のアミノ酸の中でも特にシステインやリジンと結合しやすく、この付加物を認識する抗体は市販されていて、これを用いることで酸化ストレス量を見積もることができる。そこでマウスにアセトアミノフェンを投与し、一定時間後に肝臓を採取した後、肝臓由来蛋白のウエスタンブロット解析をおこなったところ、野生型マウスに比べ KO マウスでの不飽和アルデヒド付加物の生成量が有意に高いことが判明した。以上、HO-1 RNA の発現量と、不飽和アルデヒド付加物の量的比較により、アセトアミノフェン投与後のマウスの肝臓で、野生型マウスに比べ KO マウスの酸化ストレスが高いことが明らかとなった。

(3) 膵臓 細胞死における DNase の関与  
DNase がネクロシス時に DNA 断片化を引き起こし、細胞障害の抑制に関与していることを他の組織で確認するため、ストレプトゾトシン(STZ)を用いた一型糖尿病モデルマウスの膵臓を解析した。STZ はカビの一種である放線菌に由来する抗生物質の一つで、膵臓 細胞特異的な毒性を持ち、動物の実験的糖尿病モデルの作製と 細胞由来の癌の抗癌剤として使われている。野生型と DNase KO マウスに STZ を 200mg/kg 腹腔内投与し、12 時間後、膵臓を摘出し H&E で染色した。その結果、AAP 誘導性肝障害の肝細胞核と同様、DNase KO マウスの 細胞でも核の崩壊が遅れていた。次に、TUNEL 染色で DNA の断片を解析した。DNase KO マウスでは DNA の断片が細胞核内に留まっており細胞核だけが染まっていた。野生型では膵島が全体的に染まっており DNA の断片が細胞外へ漏出していた。この結果から、DNase が STZ 膵臓 細胞死において DNA の断片化と細胞核の崩壊に関与している事が明らかになった。なお DNase KO マウスで DNase が無くても TUNEL 陽性となるのは、他の DNA 切断酵素、おそらく DNase I による DNA 切断のためと考えられる。さらに核の崩壊が遅れることによる生体への影響を見るために STZ(200mg/kg)を DNase KO マウスと野生型マウスに腹腔内投与し、体重変化の観察を行った。その結果、野生型マウスでは DNase KO マウスに比べて体重が増し、KO マウスでは減少する傾向にあった。なお、いずれのマウスも STZ 投与 4 日後には

糖尿病(血糖値 250mg/dl 以上)を発症した。以上より DNase は膵臓 細胞核の崩壊を促進し、DNase の欠損はかえって糖尿病の症状の悪化につながる可能性が示唆された。

#### (4) 細胞死研究の応用 牛乳房炎の早期診断法の確立

牛乳房炎は酪農経営を脅かす最大の病気であり、年間被害額は約 800 億円と概算されている。経済的観点ばかりでなく、安定で安心な牛乳の供給という観点からも克服しなければならぬ重要な課題である。これまで乳房炎は病状がかなり進行しないと診断できず、治療も後手にまわっていた。乳房炎の発症には、細菌感染ばかりでなく、壊死細胞より放出される核内成分(ヌクレオソーム、HMGB1、SAP130 等)が炎症の誘発に重要であると予想されている。我々は、炎症初期に壊死細胞から遊離するこれらの炎症誘発物質に注目し、これを簡単に検出できる方法を見出している。この方法を応用して、牛乳房炎の早期診断に活用することを考えた。その結果、核内蛋白 HMGB1 が乳房炎ミルク中に漏出し、その量は乳房炎重症度と相関していることを見出した(Furukawa et al. Vet Res Commun. 2011)。HMGB1 は炎症誘発物質としても知られていることから、HMGB1 の漏出が炎症症状の悪化を招いている可能性も予想された。これらの発見は HMGB1 を標的とした早期診断法と、新規治療法の開発につながるものと期待される。今後は、検出感度の精査、さらには新規検出系の可能性などに関して検討を行いたい。

#### 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 6 件)

Furukawa, Y., Hayashi, T., Mizuta, M., Ebara, S., Kiku, Y., Ozawa, T., Matsubara, T., Ito, I., Kitamura, D., Mizuta, R.: Increased concentration of high-mobility-group box 1 (HMGB1) protein in milk is related to the severity of bovine mastitis. *Vet Res Commun.* 35, 47-54. (2011)

Mizuta, R.: Transcribed Guanine-rich RNA Aggregates on Template DNA and Changes Its Conformation. *Chemistry Letters* 39, 1088-1089, 2010.

Mizuta, R., Mizuta, M., Araki, S., Suzuki, K., Ebara, S., Furukawa, Y., Shiokawa, D., Tanuma, S., Kitamura, D. DNase -dependent and -independent apoptotic DNA fragmentations in Ramos

Burkitt's lymphoma cell line.  
*BIOMEDICAL RESEARCH* 30, 165-170, 2009  
Okamoto, N., Okamoto, M., Araki, S.,  
Arakawa, H., Mizuta, R., Kitamura, D.  
Possible contribution of Dnase to  
immunoglobulin V gene diversification.  
*Immunology Letters* 125, 22-30, 2009

[学会発表](計 12 件)

水田龍信、三沢正行、荒井智也、北村大  
介：DNA断片化と細胞核の分解。第 34 回  
日本分子生物学会、横浜、2011 年、12  
月 15 日。

水田龍信、菊佳男、尾澤知美、松原朋子、  
林智人：乳汁中 HMGB1 蛋白量はウシ乳房  
炎重症度と相関する。第 16 回日本乳房  
炎研究会学術集会、筑波、2011 年、10  
月 14 日。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水田 龍信 (MIZUTA RYUSHIN)  
東京理科大学・生命科学研究所・准教授  
研究者番号：50297628