

## 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 4月27日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790416

研究課題名（和文） 敗血症性ショックにおける新規alarmin分子HMGN1の機能解析

研究課題名（英文） Evaluation of the mechanism for the release of HMGN1, an alarmin, from LPS stimulated cells.

研究代表者

村上 泰介（MURAKAMI TAISUKE）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40384135

研究成果の概要（和文）：

High mobility group nucleosome binding domain 1（HMGN1）は非ヒストン性核タンパク質であり、細胞外へ漏出すると樹状細胞を集め、免疫反応を増強することから alarmin の一種である可能性が示唆されている。本研究では、敗血症の病態における HMGN1 の役割を調べるためにマクロファージ系細胞をリポ多糖で刺激し、HMGN1 がリポ多糖刺激による細胞死にともなって放出されるが、この細胞死とは IL-1 $\beta$ 非依存的であり、また apoptosis にはないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

HMGN1, a non-histon chromosomal protein, induces the recruitment of dendritic cells into the sites of HMGN1 administration, and enhances the antigen-specific immune responses. Thus, HMGN1 is estimated to act as an alarmin, when released in the extracellular milieu. In this study, we elucidated the mechanism of HMGN1 release from mouse macrophage RAW cells by LPS stimulation. HMGN1 release was accompanied with cell death which is not affected by Ac-YVAD-CHO, a specific inhibitor of caspase-1. Together these observations indicate that HMGN1 release is accompanied with the LPS-induced cell death, which is independent of caspase-1 activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：敗血症、alarmin、感染免疫、リポ多糖（LPS）

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染によって起こる全身性の炎症反応であり、致命的な経過を辿ることの多い重篤な病態である。敗血症の多くにグラム陰性菌、陽性菌が関与しており、起因菌がグラム陰性菌の場合、リポ多糖

(lipopolysaccharide: LPS)によって敗血症性ショックが引き起こされ、多臓器不全を引き起こす。近年、自然免疫の分野では、これら微生物由来の病原因子（pathogen associated molecular patterns: PAMPs）に対する宿主の生体防御機構の解析が進み、宿

主細胞の Toll-like receptor や NOD といったパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) を介して免疫担当細胞が活性化され、多彩な炎症性メディエーターの産生が誘導されることが分かってきた。また、重症敗血症の病態では宿主の細胞死の変調を来し、Tリンパ球や肺胞、腸管などの上皮細胞のアポトーシスが亢進する一方、好中球のアポトーシスが抑制され、活性化された好中球が産生する活性酸素などにより組織の損傷、ひいては臓器不全が引き起こされる。

生体にはこのような感染の重篤化、あるいは外傷による組織障害が起こると、危険信号を周囲に伝える”alarmin”と呼ばれる一連の分子が存在する。alarmin は、(1) 死細胞 (アポトーシスによる死細胞を除く) から素早く放出される、(2) 免疫担当細胞 (主にマクロファージなど) からは細胞死を伴わず、小胞体輸送などを介して能動的に分泌される、(3) 樹状細胞を含む免疫担当細胞を活性化することで、自然免疫のみならず直接、あるいは間接的に獲得免疫をも促進する、(4) 侵襲そのものや炎症による二次的な障害によって破壊された組織の再生を促し、生体の恒常性維持に寄与するなどの4つの性質を有する“内因性物質”と定義される。最もよく研究されている alarmin としては非ヒストン核内タンパク質である HMGB1 (high mobility group box-1) が知られている。また、抗菌ペプチドである defensin、cathelicidin (ヒト LL-37) や heat shock protein (HSPs) と共に、HMGB1 と同じ核内タンパク質である nucleolin などが alarmin の候補として考えられており、それぞれが特定の受容体を介して単球・マクロファージや好中球、リンパ球、樹状細胞の活性化、あるいは獲得免疫を誘導し、組織の修復に関わることが報告されている。

HMG1 (High mobility group nucleosome binding domain 1) は HMGB1 と同様に非ヒストン核タンパク質であり、細胞内ではクロモソームに結合して発生や分化を調節することが知られている。さらに最近、HMG1 は末梢血単核球の細胞死に伴ってひとたび細胞外へ流出すると、樹状細胞に対する走化性因子として働き、その成熟化を促すことが報告された。従って、HMG1 は新たな alarmin 候補になりうる可能性がある。

## 2. 研究の目的

敗血症の病態では、過剰に産生された活性酸素などにより、組織の損傷が起こりやすくなっている。一方、生体は感染の重篤化、あるいは外傷による組織障害に際し、危険信号を周囲に伝える”alarmin”と呼ばれる一連

の分子を細胞外に放出し、免疫担当細胞を刺激・賦活化する。核内タンパク質である HMG1 は、細胞外に漏出すると、樹状細胞に対するサイトカイン産生・分化誘導能を示すことが最近見出され、alarmin 候補として注目されているが、実際に敗血症の病態で働いているかは不明である。本研究では、HMG1 の敗血症における動態、種々の免疫担当細胞への作用を解析し、HMG1 の役割を明らかにし、HMG1 が新たな敗血症治療のターゲット分子となり得るかを評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞系における HMG1 検出方法の確立

マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 に対して、グラム陰性菌 LPS (*E. coli* O111:B4) で刺激を行い (100 ng/ml)、培養上清中へ HMG1 が放出されるかを市販の抗体を用いて western blot 法により検出した。また、刺激に際し細胞の apoptosis、あるいは caspase-1 の活性化や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの産生を伴う pyroptosis の影響をみるために全 caspase 阻害剤である zVAD-fmk あるいは caspase-1 特異的阻害剤である Ac-YVAD-CHO を添加して、HMG1 の放出に与える影響を調べた。培養上清中の HMG1 は非常に低濃度であったため、培養上清は TCA 沈殿法を用いて濃縮後に電気泳動を行った。

(2) LPS 刺激による LDH の放出と IL-1 $\beta$  の産生  
RAW264.7 細胞を LPS 刺激し、培養上清中への Lactate dehydrogenase (LDH) の放出を細胞死の指標として測定した。加えて pyroptosis の指標として IL-1 $\beta$  の測定を ELISA 法を用いて行った。

### (3) LPS 刺激されたマクロファージ内での HMG1 の局在

微生物成分に刺激を受けた抗原提示細胞やマクロファージ内での HMG1 の局在を調べる目的で、免疫蛍光染色を行った。RAW264.7 を LPS 刺激し、一定時間ごとに PFA で固定後に膜透過処理を行い、抗 HMG1 抗体および Alexa594 標識二次抗体を用いて検出した。対照として殻を Hoechst33342 で染色した。

## 4. 研究成果

### (1) HMG1 の放出

LPS 刺激された RAW264.7 細胞の上清において、HMG1 の検出が可能であった。HMG1 は、刺激後短時間では細胞外へ放出されず、刺激 20 時間後に検出された。Caspase 阻害剤の添加の影響については、Ac-YVAD-CHO は HMG1 の放出に影響を示さなかったが、zVAD-fmk の添加により培養上清中の HMG1 の濃度は著し

く上昇していることが分かった。

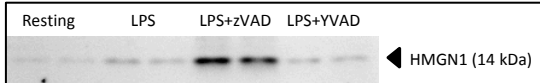


図1. LPS 刺激した RAW264.7 細胞から培養上清中への HMGN1 の放出。

(2) LPS 刺激による LDH の放出と IL-1 $\beta$  の産生

ある種の alarmin (HMGB1 等) はマクロファージ・単球から LPS 刺激により能動的に放出されることが報告されている。HMGN1 の放出が同様に細胞の活性化によるものか、あるいは細胞の死によって細胞内の成分が漏出した結果なのかを調べるために LPS 刺激した RAW264.7 細胞の上清への LDH の放出および IL-1 $\beta$  の産生を測定した。LDH は時間依存的に放出され、この上昇は caspase-1 阻害剤である Ac-YVAD-CHO では抑制されなかった。また、全 caspase 阻害剤である zVAD-FMK/zVAD-fmk の添加によって上清中の LDH の活性が著しく上昇した。IL-1 $\beta$  は時間依存的に上昇し、この上昇は caspase 阻害剤である Ac-YVAD-CHO および全 caspase 阻害剤である zVAD-FMK によって抑制された。

図2. 培養上清中の LDH の活性

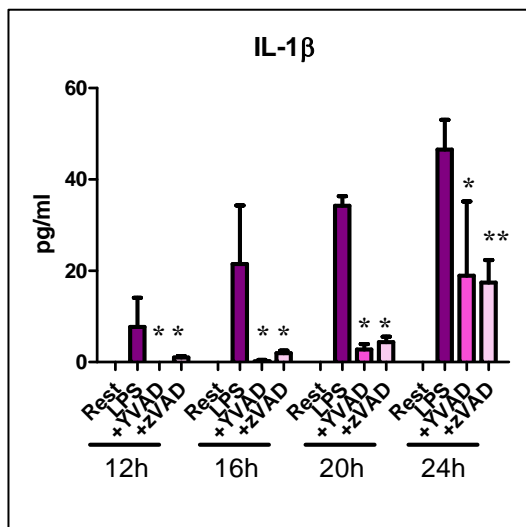
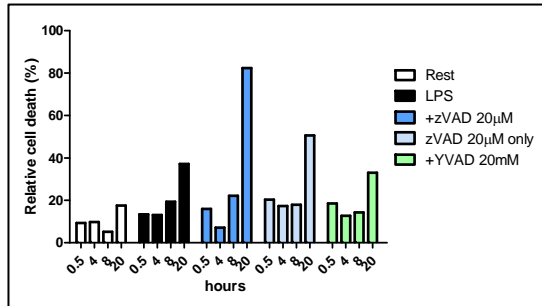


図3. 培養上清中の IL-1 $\beta$  産生

(3) HMGN1 の細胞内局在

核内タンパク質である HMGN1 は、通常核内の DNA と結合した状態で存在している。LPS 刺激に依ってこの局在に変化が見られるかを免疫蛍光染色法で調べた。HMGN1 は刺激直後は Hoechst で染色された核と共在していたが、8 時間程度から細胞質全体へ核から漏出していることが分かった。

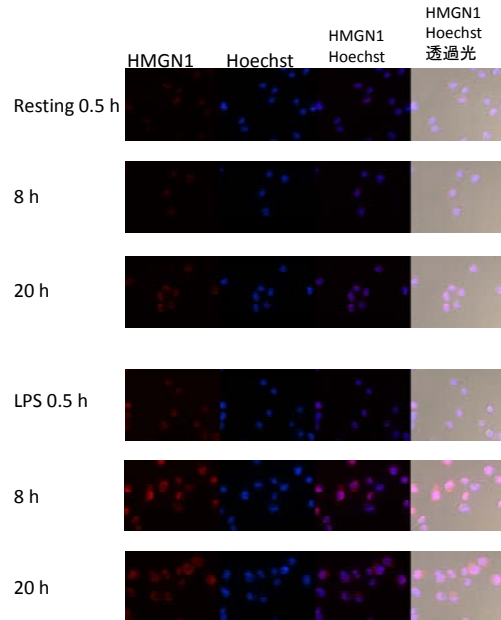


図4. LPS 刺激 RAW264.7 細胞における細胞内局在の変化

(4) まとめ

本研究では、敗血症性ショックのの主たる原因であるグラム陰性菌 LPS 刺激により上清中の LDH、IL-1 $\beta$  が HMGN1 にともなって放出されることが分かった。caspase-1 阻害剤 Ac-YVAD-CHO および全 caspase 阻害剤 zVAD-FMK の添加は IL-1 $\beta$  の放出を抑制したが、LDH と HMGN1 の放出を抑制しなかった。これらの結果から、HMGN1 は、LPS 刺激により誘導された細胞死にともなって放出されるが、その放出は caspase-1 の活性化 (IL-1 $\beta$  放出をとともなう細胞死である pyroptosis) によらない可能性が示された。zVAD-fmk による細胞死の亢進については、近年、LPS 刺激時に併用すると caspase-8/RIP1 を介した necrotic な細胞死が増強されるとの報告があり、この観点からも HMGN1 の放出が壊死性細胞死に関連したものであることが示唆された。

本研究結果により、HMGN1 が敗血症の病態において検出される濃度の LPS によってマクロファージから放出されることが明らかになった。しかしながら、実際の敗血症モデル動物やヒト症例において血中の HMGN1 濃度が上昇しているのかなどは今後検討せねばならない問題として残っている。

## 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2件)

- ① Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K, Nagaoka I: Human antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells. *Int Immunol* 23: 185-193, 2011. 査読有
- ② Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: Suppressive actions of resolvin D1 on the production and release of septic mediators in D-galactosamine-sensitized endotoxin shock mice. *Exp Ther Med* 2: 57-61, 2011. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Murakami T, Tamura H, Nagaoka I: Evaluation of the mechanism for the release of HMGN1, an alarmin, from LPS stimulated RAW264.7 cells. 日本細菌学会雑誌 67: 156, 第85回日本細菌学会総会, 長崎, Mar 27 2012.
- ② Suzuki K, Murakami T, Tamura H, Nagaoka I: An antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced endothelial cell apoptosis in vitro and in vivo. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Program 183, Sapporo, Sep 8 2011.
- ③ Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Nagaoka I: The effect of resolvin D1 on D-galactosamine-primed endotoxin shock model in mice. The three Rs of immunity: recognition, response and resolution. 213, Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, Vancouver, Oct 8 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 泰介 (MURAKAMI TAISUKE)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 40384135