

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790755

研究課題名（和文）白血球による糖ヌクレオチド解析を基盤とした COPD 発症機構の解明

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

研究代表者

高宮 里奈 (TAKAMIYA RINA)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・基幹研究所研究員

研究者番号：70365419

研究成果の概要（和文）：

白血球の機能異常が COPD 発症の一因である事が示唆されている。タバコ煙で曝露により、マクロファージは Bisecting GlcNAc 修飾されたタンパクの増加が認められた。また、酸化ストレスを軽減する事が知られている抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1 (RvE1) の添加により、マクロファージ内での活性酸素種の産生が抑制され、その結果機能が改善された。以上の結果より、RvE1 は今後臨床の現場においても、新たな治療法につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that cigarette smoke (CS) induces disability of macrophage function by oxidative stress. We indicated that CS induced bisecting GlcNAc modification in macrophage. Furthermore, pretreatment of macrophages with a pro-resolving mediator, Resolvin E1 (RvE1) restored the phagocytic activity and reduced cell death induced by treatment of CSE. These results suggest that RvE1 have new potential therapeutic applications in COPD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：抗炎症性脂質メディエーター、慢性閉塞性肺疾患、マクロファージ、活性酸素種

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) の治療開発は急務な課題である。COPD の主たる原因は喫煙であり、タバコ煙成分を介した酸化ストレスから、白血球から活性酸素やプロテアーゼが放出される事により本症の発症に関わる事が示唆されている。しかしながら、タバコ煙成分が白血球の機能

変化にもたらす分子機構や、白血球機能改善を目的とした治療法の開発は進んでいない。これまでの申請者の検討より、CSE やタバコ成分のうちアルデヒド化合物であるアクロレインによって、マクロファージのアクチン骨格に異常がおき、大腸菌の貪食能の低下を引き起こしている事が分かった。また、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より、CSE やアクロレインは、細胞内 flux 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、NADPH オキシダーゼの複合酵素系の一つである p47-phox の膜への移行の亢進が認められた。そのため、CSE やアクロレインは、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事が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これまで行なってきたメタボローム解析に加え、糖ヌクレオチドや糖鎖解析を同時に行ない、糖タンパク質の糖鎖の多様性から、CSE により起こる白血球機能異常のメカニズムを明らかにする事を目標とする。また、酸化ストレスにより細胞内代謝バランスが崩壊している事が分かっている 抗酸化酵素の一つである SOD-1 の欠損マウスを用い、腹腔マクロファージの機能（食食能）解析、糖鎖解析を行ない、酸化ストレスによる糖鎖の付加が肺の気腫化などに与える影響の検討を行う事を目的とする。また、抗炎症性脂質メディエーター RvE1 がタバコ煙曝露によるマクロファージ機能低下に効果があるか検討を行い、COPD の新規治療薬としての可能性について検討を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) タバコ煙抽出液(CSE)を曝露させたマクロファージの糖鎖解析、及び機能解析
マウス、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に、CSE もしくは、タバコ煙成分の一つであるアクロレインを添加し、レクチンブロットを行い、糖鎖解析を行なう。また、機能を *E. Coli* の食食で評価を行う。

(2) SOD1 欠損マウスマクロファージの糖鎖解析、及び機能解析

SD01 欠損マウスマクロファージより、チオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージを採取し、検討を行なった。

(3) 抗炎症性脂質メディエーター RvE1 によりマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞機能回復

- RvE1 (10nM) 添加後、CSE を加え、活性酸素種の産生を DCFH-DA プローブを用い評価
- RvE1 (10nM) 添加後、CSE を加え、2 時間後さらに蛍光ラベルした *E. Coli* を添加し、食食能を評価
- RvE1 (10nM) 添加後、CSE を加え、24 時間後のマクロファージの生存能及び、MTT assay による cell viability の評価

4. 研究成果

(1) タバコ煙抽出液(CSE)を曝露させたマクロファージの糖鎖解析

RAW264.7 に CSE、アクロレイン (ACR) を加えると、マクロファージの *E. Coli* の取り込みが抑制され、その原因の一つとしてアクチン骨格の異常が認められた。CSE (図 1) やアクロレインを添加した RAW264.7 細胞では、bisecting GlcNAc 修飾された多数のタンパクの増加が認められ、この変化はわずか 30 分で起こっていた。また、他の糖鎖修飾についても検討を行ったところ、AOL によるレクチンブロットにおいても、CSE やアクロレインの添加により core fucose をもったタンパクの増加が認められた。一方、SSA や L₄PHA にレクチンブロットにより、 α -2,6-sialic acid や β -1,6-GlcNAc には顕著な変化は認められなかった。

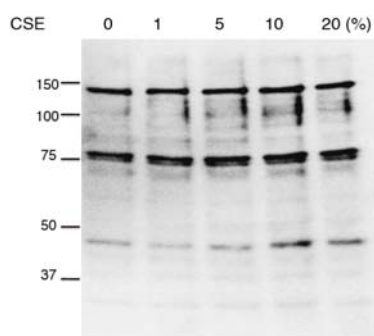


図 1 E₄-PHA によるレクチンブロット以上の結果より、タバコ煙曝露により、マクロファージは、糖鎖変化を引き起こす事が分かった。

(2) SOD1 欠損マウスマクロファージの機能、及び糖鎖解析

腹腔マクロファージを採取し、糖鎖修飾変化をレクチンブロットにより解析を行なった。SOD-1 欠損マウス腹腔マクロファージでは、CSE を添加したマクロファージと同様に野生型に比べて bisecting GlcNAc や core fucose 修飾されたタンパクの増加が認められた。また、マウス肺組織全体においても、野生型に比べて SOD-1 欠損マウスでは、Bisecting GlcNAc 修飾されたタンパクの増加が認められたが、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン糖転移酵素 (GnTIII) の酵素活性は、野生型と比べ有意な差は認められなかった。

次に SOD1 欠損によるマクロファージ機能への影響をマクロファージ食食能に着目し、*E. Coli* の取り込みについて検討を行った。その結果、SOD-1 欠損マウスマクロファージでは、*E. Coli* の取り込みが野生型のおよそ、半分まで低下していた。また、一方で、SOD-1

欠損マウスマクロファージでは、種々の酸化ストレスにより誘導される事が知られている、ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1の発現が亢進していた。

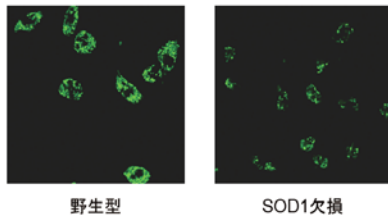


図2 SOD1欠損による *E-coli* の取り込みへの影響

以上の結果より、慢性的な酸化ストレスを受けているSOD-1欠損マウスマクロファージでは、糖鎖異常がおこり、また細胞機能にも異常がおきていることが分かった。

(3) タバコ煙によるマクロファージ機能低下におけるレゾルビン E1 (RvE1) の有用性の検討

マクロファージ細胞株 (RAW264.7) にタバコ抽出液 (CSE, 10%)、及びタバコ煙成分の一つで、非常に反応性の高いジカルボニル化合物であるアクロレイン (ACR, 10 μM) を添加した後、ファロイジンで染色による細胞化学的検討より、アクチンの状態について検討を行った。CSE や ACR の添加により、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が、RvE1 (10 nM) の前処置により、この骨格変化は改善された (図3)。

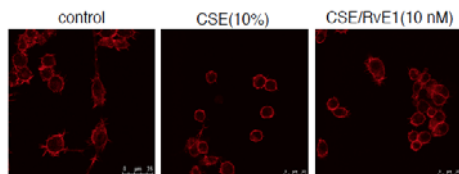


図3 RvE1による細胞骨格の維持 (ファロイジン染色)

次に、CSE および ACR で処理した RAW264.7 細胞に、FITC 標識した大腸菌を添加し検討を行った結果、RAW264.7 細胞の貪食能は通常の50%まで低下していたが、RvE1 (10-100nM) の前処理により、貪食能が改善された (図4)。

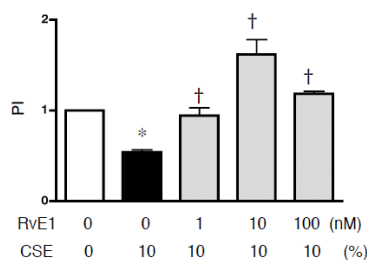


図4 RvE1による貪食能の維持

CSE の添加は、NADPH-oxidase (NOX)2 を介したマクロファージ内の活性酸素種の産生を亢進する事が知られているが、RvE1 の前処理により、NOX2 による活性酸素種の亢進が抑制された。

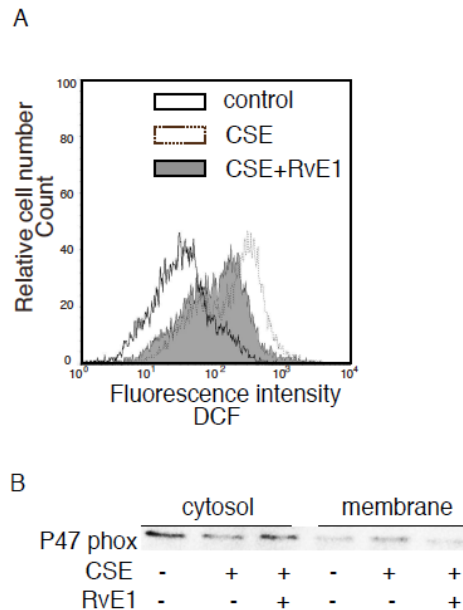


図5
A RvE1による細胞内活性酸素種の制御
B RvE1によるNOX2の制御

以上の結果より RvE1 は、タバコ煙曝露によるマクロファージ内の活性酸素の産生を抑制する事により、マクロファージの機能を回復させる COPD のこれまでにない新しいタイプの創薬となる可能性が考えられる。

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 5 件)

- ① Takamiya R, Ohtsubo K, Takamatsu S, Taniguchi N, Angata T, The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF-β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway, *Glycobiology*, 23, 178-187, 2013, 査読有り
- ② Takamiya R, Fukunaga K, Arita M, Miyata J, Seki H, Minematsu N, Suematsu M, Asano K, Resolvin E1 maintains macrophage function under cigarette smoke-induced oxidative stress, *FEBS Open Bio*, 2, 328-333, 2012, 査読有り

- ③ Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, **Takamiya R**, Takihara T, Tomomatsu K, Suzuki Y, Ogum, Sayama K, Arai H, Betsuyaku T, Arita M, Asano K, Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma, *J Allergy Clin Immun*, Available online 21 September, 2012, 査読有り
- ④ Yoshida S, Minematsu N, Chubachi S, Nakamura H, Miyazaki M, Tsuduki K, Takahashi S, Miyasho T, Iwabuchi T, **Takamiya R**, Tateno H, Mouded M, Shapiro SD, Asano K, Betsuyaku T, Annexin V decreases PS-1 mediated macrophage efferocytosis and deteriorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303, L852-L860, 2012, 査読有り
- ⑤ Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, **Takamiya R**, Fujishima S, Takano H, Ishizaka A, Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice, *Exp Biol Med (Maywood)*, 236, 315-324, 2011, 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① **高宮里奈**、大坪和明、高松真二、白土健、谷口直之、安形高志、癌関連糖鎖抗原 Sialyl-Tn によるがん微小環境調節機構の解明、第 8 5 回日本生化学会、福岡、2012 年 12 月 14 日-16 日
- ② **Takamiya R**, Ohtsubo K, Takamatsu S, Taniguchi N, Angata T, Regulation of tumor microenvironment by tumor-associated sialyl-Tn antigen through ROS production by immune cells, The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, oxidative stress and disease, Sapporo, 2012 年 7 月
- ③ **高宮里奈**、大坪和明、高松真二、白土健、谷口直之、安形高志、癌特異的糖鎖抗原 Sialyl-Tn による活性酸素種産生を伴う単球の活性化機構の解明、第 8 4 回日本生化学会、京都、2011 年 9 月 21 日-24 日
- ④ **Takamiya R**, Ohtsubo K, Takamatsu S, Taniguchi N, Angata T, Regulation of

monocyte function by tumor associated sialyl-Tn antigen through ROS production, 5th SFRR-ASIA, 8th ASMRM, 11th J-mit 2011, 2011 年 8 月 31 日-9 月 4 日

- ⑤ **高宮里奈**、大坪和明、高松真二、白土健、谷口直之、安形高志、Sialyl-Tn 抗原の認識による活性酸素種産生を伴う単球細胞株の活性化、第 6 4 回酸化ストレス学会、留寿都、2011 年 7 月 2 日-3 日
- ⑥ **高宮里奈**、永石宇司、Owen C, Hall SR, Ith B, 安形高志、谷口直之、前野敏孝、Baron RM, Perrella MA, A deficiency of heme oxygenase-1 leads to increased baseline inflammation and enhanced expression of HMGB1 in macrophages. 日本生化学会・分子生物学会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7 日-10 日
- ⑦ **Takamiya R**, Ohtsubo K, Takamatsu S, Nakajima K, Shirato K, Taniguchi N, Angata T, Cigarette smoke extract induces bisecting GlcNAc modification in RAW264.7 murine macrophage. 7th International Symposium on Glycosyltransferases, Tokyo, 2010 年 7 月 30 日-8 月 1 日
- ⑧ **Takamiya R**, Baron RM, Yet S-F, Layne MD, Angata T, Taniguchi N, Perrella MA, High mobility group A1 protein mediates human nitric oxide synthase 2 gene expression. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, 2010 年 6 月 14 日-16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 里奈 (TAKAMIYA RINA)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・基幹研究所研究員

研究者番号：70365419

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし