

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659804

研究課題名(和文)ヌクレオフォスミン：新規生体危険信号因子としての免疫活性化能の解析

研究課題名(英文)Nucleophosmin: immunoactivity as a novel alarmin

研究代表者

川原 幸一 (Kawahara, Ko-ichi)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10381170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオフォスミンは、リボソーム生合成、中心体複製、細胞周期、アポトーシス、分化、などの機能を有した核タンパク質である。最近、ヌクレオフォスミンがエンドトキシン刺激により細胞外へ放出され、そして、サイトカイン産生を惹起する。したがって、ヌクレオフォスミンは生体危険信号因子(アラミン)として示唆されている。しかしながら、ヌクレオフォスミンのアラミンとしての機能は未解決な部分が多い。よって、本研究はヌクレオフォスミンのファゴサイトーシス能を検討した。その結果、ヌクレオフォスミンは濃度依存的にRAW264.7細胞のファゴサイトーシス能を誘導し、ヌクレオフォスミンはアラミンの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nucleophosmin is a major nucleolar multifunctional protein involved in ribosome biogenesis, centrosome duplication, cell cycle progression, apoptosis, and cell differentiation. Alarmins are endogenous molecules released from activated cells and/or dying cells, which activate the immune system and cause severe damage to cells and tissue organs. Recently, the nucleophosmin is released from endotoxin-stimulated RAW264.7 cells and induces cytokines, suggesting that nucleophosmin might be an alarmin. However, nucleophosmin as a alarmin remains unclear. In this study, we found that the nucleophosmin-stimulated RAW264.7 cells significantly enhanced phagocytosis with flowcytometry. Furthermore, the nucleophosmin enhanced phagocytosis in a dose-dependent fashion. Our findings suggest that nucleophosmin may be an alarmin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：ヌクレオフォスミン アラミン 免疫活性化 ファゴサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体危険信号因子とは

生体危険信号因子 (アラミン) とは、
1. 内在性分子、2. 迅速な細胞外への放出、
3. 恒常性の機能維持、4. 免疫の活性化 (自然免疫の誘導と獲得免疫の活性化) を有している分子集団である。最も有名な分子は核内タンパクの High Mobility Group Box-1 (HMGB1) である。HMGB1 は、細胞内では生命の維持に必須な転写などに関与している。最近、HMGB1 が細胞外へ放出され、細胞外での働きは、細胞膜上の受容体、すなわち、Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)、Toll-like receptor-4 を介して免疫の活性化を誘導している。

したがって、アラミンは、遺伝子レベルでの発現を介さず、瞬時に生体の危険を察知し応答する分子である。

(2) ヌクレオフォスミン

HMGB1 は、興味深いことにヘパリンと結合する。よって、溶液中の HMGB1 の回収にはヘパリン-カラムを用いる (J Clin Invest, 2005, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008)。最近、核小体中の細胞周期に必須な分子、ヌクレオフォスミンがアラミンの可能性が示唆されている。マクロファージ細胞株 (RAW264.7 細胞) に細菌の細胞膜由来の内毒素であるエンドトキシンを添加し、その後その培養上清中にヘパリン結合タンパクを確認した。その中にヌクレオフォスミンを同定した。さらに、ラットの腹膜炎の腹水中にも NPM を検出した。また、RAW264.7 細胞に NPM を添加すると炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6) の産生を惹起した。しかしながら、アラミンとしての NPM の機能解析は極めて乏しい。したがって、本研究は、「ヌクレオフォスミンはアラミンか？」をねらいとする。

2. 研究の目的

我々は、世界に先駆けて核タンパクのヌクレオフォスミンが外来異物の侵入、そして、それに伴う炎症を察知し、生体に知らせる「生体危険信号因子 (アラミン)」を示唆する発表をした (平成 20 年、救急医学会 iPos 奨励賞受賞)。ヌクレオフォスミンは、本来、細胞内では核の中心体に存在し細胞周期に必須である。一度、生体侵襲によりヌクレオフォスミンが、細胞外へ放出されると、サイトカイン産生を惹起する。アラミンで最も有名な HMGB1 は、遊走能のみでサイトカイン産生能は、他の分子との結合によると言われている。故に、ヌクレオ

フォスミンは、全くタイプの違うアラミンである。しかし、ヌクレオフォスミンのアラミンとしての機能及び、ヌクレオフォスミンの受容体に関する報告は全く皆無である。従って、本研究の目的は、アラミンとしてのヌクレオフォスミンの解析、すなわち、貪食作用などを行うことである。

3. 研究の方法

(1) 細胞

マウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞

(2) 刺激方法

RAW264.7 細胞を 6well plates に 5×10^5 cells/well 播種した。ヌクレオフォスミンも同時に $10 \mu\text{L}$ 添加した。ヌクレオフォスミンの濃度は $10 \mu\text{g/mL}$ と $1 \mu\text{g/mL}$ として行なった。ヌクレオフォスミン刺激した RAW264.7 細胞に IgG-FITC 試薬を $50 \mu\text{L/well}$ 添加し、刺激を 12 時間行なった。刺激した細胞を速やかに回収した。

(3) 検出方法

フローサイトメトリー (メルク社) を用いて RAW264.7 細胞の貪食作用 (IgG-FITC の取り込み) を検出した。

(4) 有意差検定

有意差検定は、ボンフェローニ法を用いて解析した。

4. 研究成果

RAW264.7 細胞を用いた実験結果より、ヌクレオフォスミンが貪食作用を亢進していることを証明した。アラミンとしてのヌクレオフォスミンの機能の解析を行なうことは、様々な疾患の治療につながる事が期待できる。特に敗血症に関しては、HMGB1 と同様に新規治療法になりうる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. Upregulation of non- β Cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor A Increases Small Clusters of Insulin-producing Cells in the Pancreas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 査読有り 2014. May;122(5):308-15. doi:10.1055/s-0034-1371811.
- ② Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Koide T, Maruyama I, Tanaka

- KA. Comparative evaluation of direct thrombin and factor Xa inhibitors with antiplatelet agents under flow and static conditions: an in vitro flow chamber model. *PLoS One*. 査読有り 2014 Jan 31;9(1):e86491. doi: 10.1371/journal.pone.0086491.
- ③ Hosokawa K, Ohnishi T, Miura N, Sameshima H, Koide T, Tanaka KA, Maruyama I. Antithrombotic effects of PAR1 and PAR4 antagonists evaluated under flow and static conditions. *Thromb Res*. 査読有り 2014 Jan;133(1):66-72. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.037.
- ④ Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, Yamada S, Miyauchi T, Higuchi K, Takenaka T, Yasuda T, Matsunaga A, Kakihana Y, Hashiguchi T, Kanmura Y, Maruyama I. Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One*. 査読有り 2013 Sep 30;8(9):e75961. doi:10.1371/journal.pone.0075961.
- ⑤ Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Morimoto-Yamashita Y, Miura N, Kawahara K, Maruyama I, Murai Y, Tanaka E. Potential of the angiotensin receptor blockers (ARBs) telmisartan, irbesartan, and candesartan for inhibiting the HMGB1/RAGE axis in prevention and acute treatment of stroke. *Int J Mol Sci*. 査読有り 2013 Sep 13;14(9):18899-924. doi: 10.3390/ijms140918899.
- ⑥ Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S. Preventive effects of *Morus alba L.* anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Ther Med*. 査読有り 2013 Sep;6(3):689-695. URL:http://www.spandidos-publications.com/etm/
- ⑦ Shrestha C, Ito T, Kawahara K, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I. Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: a possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り 2013 Aug 9;437(4):573-578. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.117.
- ⑧ Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, Shameshima H, Miyoshi N, Tanimoto A, Maruyama I. Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig. *In Vivo*. 査読有り 2013 May-Jun;27(3):357-61. URL: http://iv.iijournals.org
- ⑨ Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Miyasho T, Fuchimoto Y, Yamada S, Inoue T, Shimada K, Suda K, Tanaka M, Hayashida T, Yagi H, Kitago M, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoadsorption of high-mobility group box chromosomal protein 1 using a column for large animals. *Eur Surg Res*. 2013;51(3-4):181-90. doi: 10.1159/000357563.
- ⑩ Yamahata H, Yunoue S, Tokimura H, Hanaya R, Hirano H, Tokudome M, Karki P, Yonezawa H, Sugata S, Kawahara K, Maruyama I, Arita K. Immunohistochemical expression of thrombomodulin in vestibular schwannoma. *Brain Tumor Pathol*. 査読有り 2013 Jan;30(1):28-33. doi: 10.1007/s10014-012-0095-z.
- ⑪ Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Ito T, Koide T, Maruyama I. Analysing responses to aspirin and clopidogrel by measuring platelet thrombus formation under arterial flow conditions. *Thromb Haemost*. 査読有り 2013 Jan;109(1):102-11. doi: 10.1160/TH12-06-0441.
- ⑫ Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2012 Oct;224(2):511-4. doi: 査読有り 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.027.
- ⑬ Hokari A, Ishikawa T, Tajiri H, Matsuda T, Ishii O, Matsumoto N, Okuse C, Takahashi H, Kurihara T, Kawahara K, Maruyama I, Zeniya M. Efficacy of MK615 for the treatment of patients with liver disorders. *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 21;18(31):4118-2 査読有り 6. doi: 10.3748/wjg.v18.i31.4118.
- ⑭ Kikuchi K, Kawahara K, Miura N, Ito T, Morimoto Y, Tancharoen S, Takeshige N,

- Uchikado H, Sakamoto R, Miyagi N, Kikuchi C, Iida N, Shiomi N, Kuramoto T, Hirohata M, Maruyama I, Morioka M, Tanaka E. Secondary prevention of stroke: Pleiotropic effects of optimal oral pharmacotherapy. *Exp Ther Med.* 査読有り 2012 Jul;4(1):3-7. URL;http://www.spandidos-publications.com/etm/
- ⑮ Tada K, Kawahara K, Matsushita S, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. MK615, a Prunus mume Steb. Et Zucc ('Ume') extract, attenuates the growth of A375 melanoma cells by inhibiting the ERK1/2-Id-1 pathway. *Phytother Res.* 査読有り 2012 Jun;26(6):833-8. doi: 10.1002/ptr.3645.
- ⑯ Yoshifuku A, Oyama K, Ibusuki A, Kawasaki M, Sakanoue M, Matsushita S, Kawai K, Kawahara K, Maruyama I, Kanekura T. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis as an effective treatment for Reiter disease. *Clin Exp Dermatol.* 査読有り 2012 Apr;37(3):241-4. doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04181.x.

[学会発表] (計6件)

- ① 2013年度 日本生物高分子学会 イチゴエキスは HMGB1 の放出を抑制する
大池加恵、上村龍平、丸山征郎、川原幸二 大阪 2013.11.20
- ② 2013年度 日本生物高分子学会 マクロファージにおけるプロスタグランジン合成酵素の誘導 井上智博、川原幸一、松村潔 大阪 2013.11.20
- ③ 第35回 血栓止血学会 炎症に起因する血栓症の病態解明~新規メディエーターとしての PAMPs・DAMPs~ 伊藤隆史 山形 2013.5.30
- ④ 第85回 生化学会 イチゴの新規機能：HMGB1 放出抑制
上村龍平、大池加恵、丸山征郎、川原幸一 福岡 2012.12.15
- ⑤ 第35回 日本分子生物学会 イチゴの新規機能：HMGB1 放出抑制
上村龍平、大池加恵、丸山征郎、川原幸一 福岡 2012.12.14
- ⑥ 第51回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 イチゴの新規機能：HMGB1 放出抑制
上村龍平、大池加恵、丸山征郎、川原幸二 兵庫 2012.10.20

[図書] (計3件)

- ① 大池加恵、川原幸一 北隆館 別冊 B10

Clinica 慢性炎症と疾患 骨髄-末梢血による炎症の制御と修飾 血小板-好中球のサティリテイズムと炎症 78-83 2013

- ② 大池加恵、川原幸一 先端医学社 特集 PAMPs/DAMPsと血栓症 DIC NETsとヒストン Thrombosis medicine 3(4), 334-338, 2013
- ③ 上村龍平、川原幸一 先端医学社 特集 "自然"炎症と凝固・血小板系のクロストーク (第4回) NETs(Neutrophil Extracellular Traps)と血栓症 Thrombosis medicine 2(3), 271-274, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 幸一 (KAWAHARA, Ko-ichi)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：10381170

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・特任教授
研究者番号：20082282

橋口 照人 (HASHIGUCHI, Teruto)
鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：70250917

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)
鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・特任講師
研究者番号：20381171