

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350143

研究課題名(和文) 非メチル化DNAを認識する新規受容体の探索

研究課題名(英文) Study of Novel receptors recognizing un-Methylated DNA

研究代表者

澤 智華 (Sawa, Chika)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80422541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題において、我々は以下のことを明らかにした。
細胞外核酸は直接がん細胞に作用し細胞増殖抑制を持つ。dATPのみマクロファージ様細胞株(PMA誘導U937細胞株)に作用しIL-8やTHBS-1(Thrombospondin 1)など様々な因子の発現誘導する。さらにdATPによる細胞障害性機序の解明を目的とし、酸化ストレス促進の可能性の解析を試みた。その結果、マクロファージ様細胞株において、dATP添加のみスーパーオキシドの発生誘導が確認した。壊死した細胞や好中球から放出された核酸が近傍のマクロファージに作用し、酸化ストレスを放出することで、炎症細胞等に障害を与える可能性を提唱した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I clarified the following.
(1) Extracellular nucleic acid acts directly on cancer cells and has cell growth suppression. (2) dATP acts on macrophage-like cell line (PMA induced U937 cell line) and induces the expression of various factors such as IL-8 and THBS-1 (Thrombospondin 1). Furthermore, for the purpose of elucidating the cytotoxic mechanism by dATP, we tried to analyze the possibility of promoting oxidative stress. As a result, (3) induction of superoxide generation was confirmed only in the addition of dATP in the macrophage-like cell line.
I propose the possibility that nucleic acids released from necrotic cells and neutrophils act on nearby macrophages and release oxidative stress, thus causing damage to inflammatory cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外核酸 マクロファージ 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

日本では古代より経験的に「魚介類・野菜等が健康にいい効果をもたらしてくれる」ことを知っており、食生活に取り入れてきた。食成分で様々な疾患やストレス障害を予防しようという Chemoprevention の考え方は1980年代から国内・国外で広まり、米国ではデザイナーフーズ計画が立ち上がった。これらは疾患を含む様々なストレス障害に対し予防的効果が期待できる食素材の機能成分を徹底的に究明すると共に、それらを有効に利用した新しい食メニューや補助食品を設計しようというものもある。本邦での機能性食品化学の幕開けは、1984年度に「食品機能の系統的解析と展開」とする文科省科学特定領域研究が立ち上げられ、現在の「機能性食品科学」の創生・発展に大いに繋がっている。これまでにユリ・ネギ・ショウガ・アブラナ・セリ・ミカン科に属する野菜や果物などが疾患予防性食材として高く評価されているが、これら研究成果は主に動物実験から得られた体内動態を検証するものであり、*In vivo*での詳細な分子レベル的機序解析が次の課題として残されている。

2. 研究の目的

本研究は現在、非栄養成分として考えられている「核酸栄養」を研究対象とした。これまでに多く機能性食品が動物実験においてデータが集積されているが、詳細な細胞レベル・分子レベルでの解析が望まれている。核酸の免疫作用機序を細胞レベルで解析し、新規の細胞内機序の知見を得、疾患予防に対する機能性食品への開発に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

U937・PMA induced U937(マクロファージ様)・MCF-7・A549・Caco2にサケ白子DNAを添加し、サイトカイン等の分泌をRT-PCRでmRNA発現解析を行った。

さらに、Chloroquine, IKK-2inhibitor, SB203580 (MAPK 阻害剤), MyD88 二量体阻害ペプチドなどを添加し、IL-8等の産生経路を解析した。

スーパーオキシドの測定はDiogenes™スーパーオキシド測定キットを用いた。

4. 研究成果

細胞外核酸は直接がん細胞に作用し細胞増殖抑制を持つ(Fig.1)。特に乳腺癌細胞に顕著に細胞増殖抑制を示した。

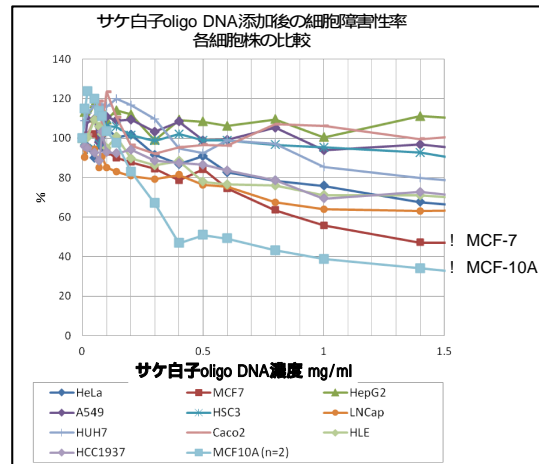


Figure.1 サケ白子 oligo DNA 添加による細胞増殖抑制の比較

dATPのみマクロファージ様細胞株(PMA誘導U937細胞株)に作用しIL-8やTHBS-1(Thrombospondin 1)など様々な因子の発現誘導する。

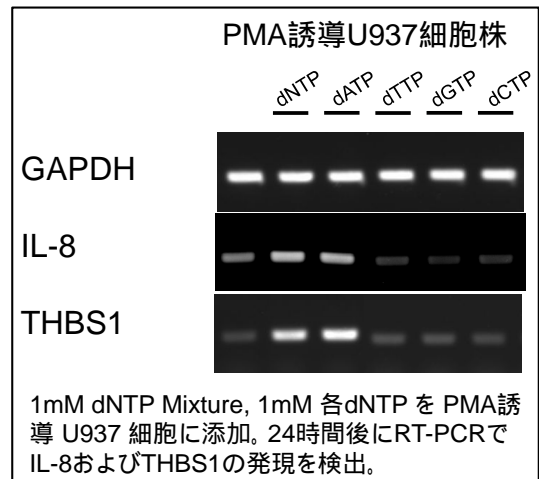


Figure 2 マクロファージ様細胞における各ヌクレオチドの刺激応答の比較

さらにdATPによる細胞障害性機序の解明を目的とし、酸化ストレス促進の可能性の解析を試みた。その結果マクロファージ様細胞株において、dATP添加のみスーパーオキシドの発生誘導が確認した。壊死した細胞や好中球から放出された核酸が近傍のマクロファージに作用し、酸化ストレスを放出することで、炎症細胞等に障害を与える可能性を提唱した。

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 1件)

1. Kiriya K, Ohtaki H, Kobayashi N, Murai N, Matsumoto M, Sasaki S, Sawa C, Satoh K, Matsunaga M, Shioda S.

A nucleoprotein-enriched diet suppresses dopaminergic neuronal cell loss and motor deficit in mice with MPTP-induced Parkinson's disease. J Mol Neurosci. 2015;55(3):803-11 (査読有)

〔学会発表〕(計 21件)

澤智華 「細胞外核酸とスーパーオキシド発生との関連性の検討」第122回日本解剖学会 2017年3月 長崎

澤智華 「細胞外核酸と酸化ストレスとの関連性の検討」第39回日本分子生物学会 2016年12月横浜

澤智華 「細胞外 dATP による細胞障害性機序の解析」第11回遺伝子栄養学研究会 2016年9月北広島

井上由理子・澤智華 「Synaptotagmin1の大量発現および発現阻害による培養神経細胞の形」第39回日本神経科学学会 2016年7月横浜

澤智華 「細胞外 dATP の生理活性機序の解析」第121回日本解剖学会 2016年3月郡山

澤智華 「細胞外 dATP の細胞刺激応答の解析」第38回日本分子生物学会 2015年12月 神戸

澤智華 「dATP のマクロファージ刺激応答の解析」第10回遺伝子栄養学研究会 2015年9月北広島

澤智華 「Global Gene Expression Analysis of immune cells in response to Nucleoprotein derived from food」第120回日本解剖学会 2015年3月 神戸

澤智華 「核酸刺激によるマクロファージ細胞内応答関連因子の網羅的解析」第37回日本分子生物学会 2014年12月横浜

澤智華 「食品由来の核酸成分による細胞内刺激応答関連因子の網羅的解析」第9回遺伝子栄養学研究会 2014年9月北広島

桐山啓介「核タンパクのがん細胞増殖抑制効果に関する遺伝子の探索」第9回遺伝子栄養学研究会 2014年9月北広島

澤智華 「食品由来の核酸成分による免疫細胞応答関連因子の解析」第12回日本抗加齢医学会 2014年6月 大阪

澤智華 「サケ白子由来核タンパクによる免疫細胞の増強効果の検討」第119回日本解剖学会 2014年3月 栃木

桐山恵介 「フローサイトメーターを用いた熱ストレスによる精巣障害後の精巣評価」第119回日本解剖学会 2014年3月栃木

桐山恵介 「熱ストレスによる精巣障害後の精巣評価」第101回日本解剖学会関東支部 学術集会 2013年10月東京

澤智華 「サケ白子核タンパクによる細胞内刺激応答の解析」第118回日本解剖学会総会 2013年3月 香川

桐山恵介 「核タンパクの摂取は SAMP8 マウスの老化に伴う記憶学習障害を軽減する」第118回日本解剖学会総会 2013年3月 香川

養父佐知子 「がん細胞に対する核タンパクの細胞増殖抑制効果」第118回日本解剖学会総会 2013年3月 香川

澤智華 「核酸による免疫細胞の増強効果の検討」第36回日本分子生物学会 2013年12月 神戸

澤智華 「核酸・核タンパク摂取による自然免疫増強の効果の検討」第8回遺伝子栄養学研究会 2013年9月北広島

- 21 桐山恵介 「核タンパクの摂取は老化促進マウスの老化に伴う空間学習能の低下を軽減する」第8回遺伝子栄養学研究会 2013年9月北広島

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤智華 (Sawa Chika)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号: 80422541

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

塩田清二 (Shioda Seiji)
星薬科大学・先端生命科学・教授
研究者番号：80102375

(4)研究協力者

養父佐知子 (Yofu Sachiko)
桐山恵介 (Kiriyama Keisuke)