

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293385

研究課題名(和文) PAMPs、DAMPsの多層的制御機構とそのトポロジー/時空軸と病態発現機序

研究課題名(英文) Multi-layered and topological regulatory system of PAMPs and DAMPs. Its relevance in various pathophysiology.

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体侵襲に際して発生、あるいは侵入してくる分子群；すなわち内因性因子のdamage associated molecular patterns(DAMPs)、あるいは外来性因子のPathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) は侵襲局所でalarminsとして統合され、生体側のTLRs発現細胞により認識されて、生体防御反応と修復を誘導する。しかしその時空間的な過剰・逸脱はショック、DIC/MOFなどの重篤な病態を招来する。

本研究ではこのalarminsの時空軸を考慮した治療法の必要性を論ずる。

研究成果の概要(英文)：Upon injuries and invasions, locally generated damage associated molecular patterns(DAMPs) and invaded molecules of pathogens, pathogen associated molecular patterns(PAMPs) are integrated as alarmins, and recognized by toll-like receptors(TLRs)-expressing cells including epithelial cells and immune cells, and result the formation of total defensive system in situ. These DAMPs and PAMPs, however, should be localized in the local injurious sites and be limited active temporarily.

This spatio-temporal axis of DAMPs/PAMPs-TLRs is very important for the expression of most optimum defense system and following resolution and wound repair. The excess and deviations of reactions induced by DAMPs/PAMPs cause shock, DIC and multi-organ failures. Based on these data, we propose a rationale of therapeutic principles for injuries, infections and malignancies for prevention of systemic involvements including DIC, shock and multi-organ failures.

研究分野：生体侵襲学、血液凝固学

キーワード：Alarmin PAMPs DAMPs HMGB1 Histones DIC Shock 多臓器不全

1. 研究開始当初の背景

生体は常に大小の侵襲下にあり、これらに対して、神経系、内分泌系、炎症/免疫-修復系などのネットワークで応答する。これらの各ネットワークも閉じられた系ではなく互いに連結し、クロストークしつつ大きな円環(circular network)を形成して応答している。

このうち、特に外傷や感染に対応する免疫/炎症システムは、時々刻々と複合して応答する必要があることから、外傷⇒循環バリアー破綻に際する[Sensing]-[Reaction/Control]-[Resolution]の「各コンパートメント」はシームレスに連結した“コヒーレントな反応系”となっている。

この生体防御のコヒーレント反応系のトリガーは、バリアー破綻によって直ちに開始される。バリアーが破たんすると、生体は“その場、その時”に最もふさわしい質と量で応答(temporo-spatial reactions)を開始する。ここで重要な働きをするのが、病原微生物由来の分子群：pathogen associated molecular patterns (PAMPs)と自己組織由来分子群：damage associated molecular patterns (DAMPs)と呼ばれている分子群で、これらは上皮系細胞に普く発現している PRRs (pattern recognition receptors)：Toll Like Receptors (TLRs)で認識されて、円滑な応答の誘導に資されている。従って、PAMPs、DAMPsは一括してアラミン(alarmin)ともよばれている。

そして、最近の新たな展開はPAMPs/DAMPs(alarmin)⇒TLR 応答系は、反応の終焉、修復(resolution)にも連結していることが判明しつつある。また、この反応の終焉⇒終焉のステップでも、“その場・その場の分子群”が使われている。そこでこの際の分子群はresolution associated molecular patterns (RAMPs)と呼ばれている。

2. 研究の目的

生体が時々刻々と変貌する環境の中で持続して生存するためには、常に変化する環境をセンスし、その場と時に最もふさわしい応答を選択する必要がある。本申請での文脈でいうと“alarmins に対する反応の場と反応時間の制御の仕組み(temporospatial regulation)”はどのようにになっているのか?ということになる。

そこで本課題では、alarmin に対する応答の様式を探ることでこの問題にアプローチした。

具体的にはDAMPsの中でも最も代表的なHMGB1(High Mobility Group Box 1)とヒストンを取り上げ、その量のみならず、分子状態の変化と(質)その活性・動態からこの問題にアプローチすることにした。

具体的な課題は以下の通りである。

alarminsの反応の場と時の制御の仕組み(temporospatial regulation)はどのようにになっているのか?それに対して制御法、測定法を開発することを最終目標とする。

(1) HMGB1の分子の多様性と生理活性

これを明らかにして、病態の診断と介入策を考案する。

(2) ヒストンの分子の多様性と生理活性

ヒストンの細胞外放出の細胞機序を解明し、診断・治療に結びつける。特にシツルリン化の影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) alarmin: HMGB1の分子多様性と活性と3分子種を識別反応するモノクローナル抗体の作製

HMGB1は各種壊死細胞からは受動的に、刺激細胞からは能動的に、細胞外に放出される。分子内には3個のSH基があり、その酸化状態で、全還元型、部分酸化型、全酸化型の3型をとる。放出直後は全還元型で、炎症細胞に対して遊走能があり、炎症細胞を周囲に集簇させ、部分酸化型はそれらの集簇してきた炎症細胞を活性化して、炎症性サイトカインを産生・放出させる。一方、全酸化型はこれらの活性を欠く、と報告されている(図1)。

従って病態の診断や考察という視点から観ると、HMGB1の3つのアイソフォームを識別して測定、あるいは解析(病理標本の組織染色など)する必要がある。そこで牛胸腺より、純化精製したHMGB1の分子状態を酸化、還元して3つのアイソフォームを分取して、モノクローナル抗体の作製を試みた。

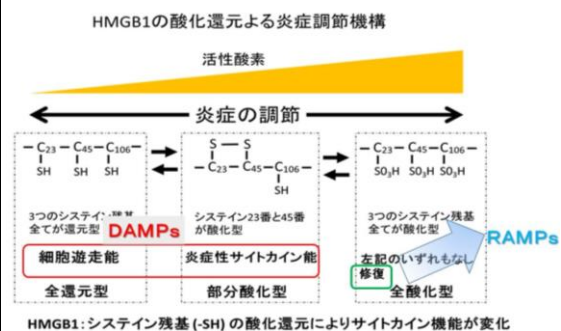


図1. HMGB1の3つのアイソフォームと細胞生理活性

(2) ヒストンの高感度測定キットの開発

現在は免疫ブロット法での値と解離（ブロット法が高い）しているので、その原因を解明する。

(3) RAMPs の機能

現在、PAMPs として認知されているのは、Heat Shock Protein-10, -27, $\alpha\beta$ クリスタリン、BiP(Binding of immunoglobulin protein) である。そこで果たしてこれらが RAMPs としての機能を発現するかいなか、について、まずは BiP の機能を検討した。方法としては、血管内皮細胞における BiP の機能を、thrombomodulin (TM) と血小板機能に関して研究した。

4. 研究成果

(1) HMGB1 の 3 つのアイソフォームを分別して認識するモノクローナル抗体

今のところ、HMGB1 の 3 つのアイソフォームを分別認識するモノクローナル抗体作製には成功していない。

当初の計画では、炎症活性の強い proinflammatory HMGB1 と強く反応するモノクローナル抗体を取得して、治療への展望を拓くことを目的としていたが、それに関しては現時点では未完成である。ただ、反応性の強弱のあるモノクローナル抗体の作製には成功したので、それらの組み合わせで 3 つの HMGB1 の半定量は可能である（還元型に対して反応性が高い抗体は採取しえた）。

(2) ヒストン測定系の開発

これに関しては、ELISA 法の確立に成功している。現在その特異性、感度を検証中である。

(3) RAMPs の機能

① すでに RAMPs として認識されている BiP の内皮細胞における細胞生理活性

まず BiP について活性を調べたところ、培養内皮細胞において、BiP が TM 発現を増強することが判明した。

これは BiP の RAMPs 機能に当るものと考えられる。

② BiP は血小板の機能を抑制することが判明した。これも BiP の炎症や凝固の終焉能、修復能の一端と考えられた。

BiP のその他の RAMPs 機能に関しては研究続行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tancharoen S, Gando S, Binita S, Nagasato T, Kikuchi K, Nawa Y, Dararat P, Yamamoto M, Narkpinit S, Maruyama I. HMGB1 Promotes Intraoral Palatal Wound Healing through RAGE-Dependent Mechanisms. Int J Mol Sci. 査読有. 2016;23:17(11). pii:E1961. DOI:10.3390/ijms17111961
- ② Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. Obesity(Silver Spring). 査読有. 2016; 24(9):1913-21. DOI:10.1002/oby.21549.
- ③ Hosokawa K, Ohnishi-Wada T, Sameshima-Kaneko H, Nagasato T, Miura N, Kikuchi K, Koide T, Maruyama I, Urano T. Plasminogen activator inhibitor type 1 in platelets induces thrombogenicity by increasing thrombolysis resistance under shear stress in an in-vitro flow chamber model. Thromb Res. 査読有. 2016;146:69-75. DOI:10.1016/j.thromres.2016.09.002.
- ④ Ito T, Kakihana Y, Maruyama I. Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases. Expert Opin Ther Targets. 査読有. 2016; 20(2):151-8. DOI:10.1517/14728222.2016.1086750.
- ⑤ Iba T, Ito T, Maruyama I, Jilma B, Brenner T, Müller MC, Juffermans NP, Thachil J. Potential diagnostic markers for disseminated intravascular coagulation of sepsis. Blood Rev. 査読有. 2016;30(2):149-55. DOI:10.1016/j.blre.2015.10.002.
- ⑥ Fujita H, Yagishita N, Aratani S, Saito-Fujita T, Morota S, Yamano Y,

Hansson MJ, Inazu M, Kokuba H, Sudo K, Sato E, Kawahara K, Nakajima F, Hasegawa D, Higuchi I, Sato T, Araya N, Usui C, Nishioka K, Nakatani Y, Maruyama I, Usui M, Hara N, Uchino H, Elmer E, Nishioka K, Nakajima T.

The E3 ligase synoviolin controls body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1 β . EMBO J. 査読有. 2015;15;34(8):1042-55. DOI:10.15252/embj.201489897.

- ⑦ Tanaka M, Shinoda M, Takayanagi A, Oshima G, Nishiyama R, Fukuda K, Yagi H, Hayashida T, Masugi Y, Suda K, Yamada S, Miyasho T, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Sakamoto M, Tanabe M, Maruyama I, Kitagawa Y.

Gene transfer of high-mobility group box 1 box-A domain in a rat acute liver failure model.

J Surg Res. 査読有. 2015;194(2):571-80 DOI:10.1016/j.jss.2014.11.022.

- ⑧ Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, Noguchi K, Ito T, Imamura T, Potempa J, Kikuchi K, Maruyama I.

Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients.

PLoS One. 査読有. 2015;10(2):e0117775. DOI:10.1371/journal.pone.0117775.

- ⑨ Chaichalotornkul S, Nararatwanchai T, Narkpinit S, Dararat P, Kikuchi K, Maruyama I, Tancharoen S.

Secondhand smoke exposure-induced nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 in a rat premature skin aging model.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有. 2015;456(1):92-7.

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.040.

- ⑩ Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T.

Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment.

Lab Invest. 査読有. 2014;94(5):569-85.

DOI:10.1038/labinvest.2014.46

[学会発表] (計2件)

- ① 丸山征郎、「血栓形成に関する新しい機序とトロンビンの役割」、第120回日本循環器学会九州地方会、2016年6月25日、ホルトホール大分(大分県大分市)

- ② 丸山征郎、「救急患者体内の役者達：PAMPs/DAMPsそしてRAMPs」、第20回日本救急医学会九州地方会、2016年6月4日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

[図書] (計4件)

- ① 一瀬白帝、丸山征郎、村田 満 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「検査と診療」、2015、208
- ② 一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫郎 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「抗凝固と線溶」、2015、133
- ③ 一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「凝固と炎症」、2015、189
- ④ 一瀬白帝、丸山征郎、内山真一郎 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「血管と血小板」、2015、251

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：タンパク質分離デバイス、タンパク質を分離する方法、および、高マンノース型糖鎖の構造を決定する方法細胞老化抑制剤

発明者：堀 貫治、坂口 剛正、平山 真、丸山 征郎、黒川 洋

権利者：国立大学法人広島大学、国立大学法人鹿児島大学、旭化成メディカル株式会社

種類：特許

番号：特願 2015-026996

出願年月日：2015年2月13日

国内外の別：国内、国外

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

橋口 照人 (HASHIGUCHI, Teruto)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：70250917

山口 宗一 (YAMAKUCHI, Munekazu)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：20325814

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

(3) 連携研究者

山本 美佳 (YAMAMOTO, Mika)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究
員
研究者番号：70791507

(4) 研究協力者

永里 朋香 (NAGASATO, Tomoka)
藤森工業株式会社