

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670790

研究課題名(和文)上皮系TMの新機能：PAMPs、DAMPの分別と病態の急性増悪、転移の制御

研究課題名(英文)PAMPs, DAMPs regulation by thrombomodulin(TM). Probable role of epithelial TM

## 研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯(薬)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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：トロンボモジュリン(TM)のD2ドメインに結合すると、トロンピンは抗凝固酵素へとベクトルが変わる。一方代表的DAMPs：HMGB1と代表的PAMPs：LPSもTMのD1レクチン様ドメインに結合して活性が中和される。さらに強力なDAMPsの一つ、細胞外ヒストンもDAMPとして作用すること、このヒストンもまたTMで活性が中和されることを発見した。これらの事実からTMはPAMPs、DAMPsの機能制御活性をも有しており、これが上皮性TMの生理的役割である可能性ある。そして遺伝子組換えTMの臨床効果はTMのPAMPs、DAMPs制御にも因る可能性が浮かび上がってきた。

研究成果の概要(英文)：We previously cloned thrombomodulin(TM) cDNA and determined its structure. Human TM is composed by five domains, D1 lectin like domain, D2 with 6 EGF-like structures, E1 to E6. Thrombin binds to E4-E6 and fails its procoagulant activity. This thrombin can activate protein C efficiently. Thus TM converts thrombin from a procoagulant to an anticoagulant protease. Moreover we showed that HMGB1, a typical DAMP binds to D1 lectin like domain and loses its proinflammatory activity. After that another group showed that D1 adsorbs LPS. More recently we have showed that TM binds histones, released from necrotic cells. We showed that extracellular histones induce platelets activation. Therefore it will be considered that extracellular histones behave as a DAMP. We identified that the extracellular histones bind to TM with abolishing the proinflammatory activity. Thus TM acts as a regulator not only thrombin but also DAMPs and PAMP, LPS. This will explain the significant role of epithelial TM.

研究分野：医歯薬学

キーワード：感染症 細胞・組織 トロンボモジュリン PAMPs DAMP

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、ヒト血管内皮細胞上にトロンボモジュリン(thromomodulin, TM) が発現しており、これが血管内のトロンビンを凝固酵素から抗凝固酵素へとベクトル変換することを一連の研究で証明してきた。そして TM 遺伝子のクローニング、遺伝子・蛋白の構造決定、組換え TM の創薬化などに成功してきた。トロンビンは TM の D2 ドメインに結合する。ところが TM の代表的 DAMPs である HMGB1 も TM の D1 レクチン様ドメインで結合することを発見してきた。また台湾のグループがエンドトキシンが D1 ドメインに結合し、活性が失われること、ついで我々は、強力な DAMPs であるヒストンも TM に結合して、活性が消失することを見出した。

これらのことから、申請者らは TM は PAMPs、DAMPs の制御というあとの大きな役割を持ち、特に血管内皮細胞以外の上皮系の TM の生理的機能は PAMPs/DAMPs の制御にあるのではないか、という仮説を想定してきた。

## 2. 研究の目的

近年、【侵襲】のメディエーターは、外因性：PAMPs、内因性：DAMPs に 2 大別され、受容体 PRRs(Pattern Recognition Receptors) を介し、PAMPs PRRs NF-kB と DAMPs PRRs inflammasomes の 2 つのマシナリーで応答することが明らかとなっている。すなわち片方では“準備状態”、双方で“スイッチオン”である。一方、申請者らは血管内皮細胞のトロンビン制御蛋白：トロンボモジュリン(TM)に関して研究を持続し、最終的に創薬に成功してきた。しかしその過程で、TM が【代表的 PAMPs/DAMPs を制御すること】、【内皮細胞のみでなく、広く上皮系にも分布すること】も発見した。そこで本研究では、上皮系 TM が PAMPs/DAMPs の制御を通して非リンパ系組織の炎症の制御に大きな役割を果

たしているという仮説を証明する。

## 3. 研究の方法

(1)上皮系 TM による PAMPs/DAMPs の分子選別・制御相：培養上皮系細胞表面における発現 PRRs のスペクトラムと量、TM 発現を解析する。

(2)PAMPs, DAMPs で刺激細胞上の PRRs と TM 発現のダイナミズムの解析：

【TM 分子の PAMPs/DAMPs 制御のスペクトラム】の解析に関する実験

i)ヒト上皮系細胞 HaCaT、ヒト肺胞上皮細胞株 A549 を使い、TM、PRRs 発現のスペクトラムを解析する。

ii)TM, PRRs 発現のダイナミズムの解析

上記細胞を各種 PAMPs, DAMPs で刺激して、細胞上の TM, PRRs の発現量の変化を解析する。HaCaT においては DAMPs の一つと位置づけられている紫外線照射で、TM はダウンレギュレーション後、2 時間後からアップレギュレーションされることを観察・発表している。TM のほかに、発現 PRRs の量的・質的解析、NF-kB 活性化、inflammasome の活性化度合いを解析する。

上記の細胞応答の結果として、培養上清中の pro-IL-18/IL-18, pro-IL-1 /IL-1 を、ELISA と Western Blot を組み合わせ解析する。

in vivo 実験

i)ラット、マイクロミニプタにあらかじめ PAMPs の代表である LPS で全身チャレンジしておき(st Hit)しておき、次に皮膚局所に外科的侵襲を加え、さらに当該部位を DAMPs であるヒストンまたは HMGB1 で刺激して炎症巣を病理観察する。

ii)次に HMGB1 またはヒストンの各抗体、あるいは rTM で insitu の HMGB1, ヒストンを中和して、当該皮膚を病理観察し、細胞浸潤の度合い、IL-1、IL-18、NF-kB、inflammasomes などの染色で半定量化する。

(3) (2)の結果を生成-1 , IL-18 量で解析

(4) DAMPs:HMGB1, ヒストンや PAMPs:LPS ( ± rTM)を局所(皮膚、肺)投与した動物(ラット、ブタ)に、LPS を投与し、局所炎症の程度(成立の早さ、重症度など)を病理像から評価する。

#### 4 . 研究成果

研究成果の概要は次の通りである。

トロンビンのベクトル変換以外に、トロンボモジュリン(TM)には PAMPs、DAMPs の制御能もあるという概念を明らかにしえたこと。

(1) すなわち、これまで機能が不明であった TM の N 末端レクチン様ドメインが、代表的 DAMPs の一つである HMGB1(High Mobility Group Box-1)を吸着・分解することを明確に検証しえたこと

(2) さらに細胞外ヒストンも強い細胞毒性を発揮し、DAMPs の一つであること。

(3) さらにこのヒストンも TM に吸着されて活性を失うことを明らかにしえたこと。

TM のどのドメインに結合するののかも明らかにして現在論文作成中。

(4) これらに加えて、台湾のグループがエンドトキシン(LPS)もレクチン様ドメインに結合し、向炎症活性を消失せしめることを明らかにしたので、ここに TM はトロンビンのベクトル変換のほかに、DAMPs、PAMPs の制御機能をも有するという新規概念を確立しえたことになる。

TM は当初に提唱された血管内皮細胞以外にも皮膚や内臓粘膜など、直接は血液に接触しない上皮系細胞上に広く分布し、その理由は不明であったが、ここにこれらの TM は上皮での PAMPs /DAMPs の制御という新しい機能を発現することが明らかとなったことになる。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Overexpression of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box 1 in human dental pulp inflammation.

Tancharoen S, Tengrungsun T, Suddhasthira T, Kikuchi K, Vechvongvan N, Tokuda M, Maruyama I. Mediators Inflamm. 2014;2014:754069. doi: 10.1155/2014/754069. (査読有)

Hyaluronan protection of corneal endothelial cells against extracellular histones after phacoemulsification.

Kawano H, Sakamoto T, Ito T, Miyata K, Hashiguchi T, Maruyama I. J Cataract Refract Surg. 2014 Nov;40(11):1885-93. doi: 10.1016/j.jcrs.2014.07.026. (査読有)

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

Chaichalotornkul S, Nararatwanchai T, Narkpinit S, Dararat P, Kikuchi K, Maruyama I, Tancharoen S. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 2;456(1):92-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.040. (査読有)

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

Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, Noguchi K, Ito T, Imamura T, Potempa J, Kikuchi K, Maruyama I. PLoS One. 2015 Feb 17;10(2):e0117775. doi:10.1371/journal.pone.0117775.(査読有)

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

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

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

〔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

発明者：丸山征郎、堀貫治、坂口剛正、平山真、黒川洋

権利者：鹿児島大学、広島大学、旭化成メディカル(株)

種類：特許

番号：特願 2015-026996 号

出願年月日：平成 27 年 2 月 13 日

国内外の別： 国内

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・大学院医歯学総合研究科  
・特任教授

研究者番号：20082282

(2)研究分担者

伊藤 隆史 ( ITO, Takashi )

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科  
・講師

研究者番号：20381171

(3)連携研究者

川原 幸一 ( KAWAHARA, Ko-ichi )

大阪工業大学・工学部生命工学科  
・特任教授

研究者番号：10381170

中原 真由美 ( NAKAHARA, Mayumi )

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科  
・特任助教

研究者番号：90707514