

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670793

研究課題名(和文)新規生体危険信号因子ヌクレオフォスミンの受容体と抑制因子の探索

研究課題名(英文)The receptor and inhibitor of Nucleophosmin

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

研究成果の概要(和文)：ヌクレオフォスミンは、本来細胞内の核に存在している。すなわち、核タンパク質である。その機能はリボソームの生合成、中心体複製、細胞周期、アポトーシス、分化などである。最近、この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、そしてその放出されたヌクレオフォスミンが炎症性サイトカインを産生することがわかった。しかしながら、ヌクレオフォスミンに対する受容体や阻害剤が未だ検討されていない。したがって、本研究ではヌクレオフォスミンの受容体と阻害剤の検討を行った。その結果、受容体が判明した。

研究成果の概要(英文)：Nucleophosmin, which is a nucleoprotein, is major multifunctional protein involved in ribosomal biogenesis, centrosome duplication, cell cycle progression, apoptosis, and cell differentiation. Recently, nucleophosmin is released from endotoxin-stimulated macrophages and induces inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6, suggesting that nucleophosmin might be an alarmin. However, nucleophosmin's receptor and inhibitor remain unclear. In this study, we found the a nucleophosmin's receptor.

研究分野：医歯薬学

キーワード：外科系臨床医学 救急医学 DAMPs アラーミン ヌクレオフォスミン 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

生体危険信号因子（アラミン）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. 免疫の活性化を有している。最も有名な分子は **High Mobility Group Box-1 (HMGB1)** である。興味深いことに HMGB1 の回収には、ヘパリンカラムを用いる。研究代表者らは、その中に、核小体の細胞周期に必須な分子、ヌクレオフォスミン (NPM) を LPS 刺激細胞の培養上清、ラットの腹膜炎の腹水中に初めて検出した。さらに、サイトカイン産生 (TNF- $\alpha$ 、IL-6 など) を示し、NPM がアラミンの可能性を初めて示した (J.Leukoc.Biol.86:645:2009, 平成20年、救急医学会 iPos 奨励賞受賞)。さらに、NPM の免疫活性可能 (ファゴサイトーシス能の活性化) も証明した (挑戦的萌芽平成24,25年度)。したがって、NPM は新規のアラミンと示唆された。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。本研究では、「ヌクレオフォスミンの抑制は新規敗血症治療に繋がるか？」を目的とする。

### (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 Endoproducs ( 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- $\alpha$ )、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

敗血症の病態の進行に伴い、細胞の核から生命維持に必須なタンパク質が放出され本来の生命維持機能とは全く逆の、生体を死へ導く。よって、この核タンパク質の制御は、敗血症の病態尤進抑制につながる。最近、研究代表者らは世界に先駆けて NPM をアラミンとしての可能性、さらには、免疫活性可能を証明してきた。しかしながら、NPM の受容体、さらには、抑制因子が未だ解決されていない。したがって、本研究では、さらなる敗血症の病態の解明を進めるために、NPM の受容体の同定、NPM のアラミン活性の抑制物質の同定を目的とする。将来的に、他の核タンパク質群 (HMGB1、ヒストン) との関連性を解明し、敗血症患者の劇的な治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

NPM はエンドトキシンなどの刺激により細胞外へ放出される。そしてサイトカインとして振舞う。これは既に報告されている HMGB1 の挙動に似ている。HMGB1 の受容体は Toll-like receptor (TLR) -4 より、NPM もその可能性が示唆される。したがって、以下の様な実験を行った。

### (1) 細胞

マウスマクロファージ由来細胞 RAW264.7 (ATCC 社(American Culture Collection))を使用した。

### (2) 試薬

阻害剤 lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS) (invivogen 社)

### (3) ELISA キット

マウス tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  (Biologend 社)

### (4) 実験方法

a. RAW264.7 細胞を 24well に  $5 \times 10^5$  コ /well 播種し、一日静置する。

- b. a.の細胞を opti-MEM (ライフサイエンス社) で洗浄し、最終的に 400uL の opti-MEM に置き換える。
- c. 1 時間静置後、阻害剤 LPS-RS (最終濃度 50ng/ml) を添加する。
- d. さらに 1 時間後、NPM (最終濃度 25ng/ml) を添加する。
- e. NPM 刺激 16 時間後、培養上清を回収する。回収方法は、1.5ml チューブに 400uL を添加する。次に 5000rpm、5 分遠心分離を行い、その上清 350uL を新しい 1.5ml チューブで回収する。ELISA 実験を行うまでに -20°C で保存する。
- f. d.の上清を ELISA 法により TNF- $\alpha$  を測定する。ELISA 法はキットのプロトコール通りに行った。

#### (5) 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。有意差の判定は  $P$  値が 0.05 未満で行った。

#### 4. 研究成果

- a. NPM 濃度依存的に TNF- $\alpha$  を産生する。  
NPM の濃度を 0, 12.5, 25, 50, 100 (ng/ml) において濃度依存的に TNF- $\alpha$  の産生を惹起した。NPM の濃度 25ng/ml より有意差が見られた。  
これ以降の実験は NPM の最終濃度を 50ng/ml で行った。
- b. NPM 特異的に細胞に刺激を惹起する。  
NPM を 100°C 5 分間行い、NPM の作用が消失するかを検討した。その結果、100°C 5 分間処理を行った NPM はもはやサイトカイン産生能を有していなかった。  
したがって、本実験で用いた NPM 自身がサイトカイン産生誘導能を有し、エンドトキシンなどの混入によるサイトカイン産生能ではないことが証明された。
- c. NPM の受容体は TLR-4 の可能性が示唆された。TLR-4 のアンタゴニストにより、NPM の刺激 (TNF- $\alpha$  産生) が抑制された。  
したがって、TLR-4 が受容体である可能性が示唆された。

#### 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 9 件)

- ① Liaw P, Ito T, Iba T, Thachil J,

Zeerleder S

“DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC”  
Blood Rev. 2016 in press  
doi: 10.1016/j.blre.2015.12.00  
査読有り

- ② Morimoto-Yamashita Y, Kawakami Y, Tatsuyama S, Miyashita K, Emoto M, Kikuchi K, Kawahara K, Tokuda M. A natural therapeutic approach for the treatment of periodontitis by MK615. Med Hypotheses. 2015 Nov;85(5):618-21.  
doi: 10.1016/j.mehy.2015.07.028.  
査読有り
- ③ Kohyama, M., Yabuki, A., Kawasaki, Y., Kawaguchi, H., Miura, N., Kitano, Y., Onitsuka, T., Rahmann, MM., Miyoshi, N., Yamato, O. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease) in a mixed-breed dog. J Am Anim Hosp Assoc 51(6), 369-400, 2015 Nov. 査読有り  
URL:[http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6258?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6258?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&)
- ④ Morishita, S., Kawaguchi, H., Ono, T., Miura, N., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Kato, H., Tanimoto, A., Nishino H. Enteric lactoferrin attenuates the development of high-fat and high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Microminipigs. Biosci Biotechnol Biochem. 2015 Nov 7:1-9  
doi: 10.1080/09168451.2015.1091713.  
査読有り
- ⑤ Otomaru, K., Fujikawa, T., Saito, Y., Ando, T., Obi, T., Miura, N., Kubota, C. Diagnostic imaging of intra-abdominal cyst in heifer using the computed tomography. Journal of Veterinary Medical Science, 2015. Oct 1;77(9):1191-3  
doi: 10.1292/jvms.15-0153.  
査読有り
- ⑥ Noguchi, M., Miura, N., Ando, T., Kubota, C., Hobo, S., Kawaguchi, H., Tanimoto, A. Profiles of reproductive hormone in the microminipig during the normal

estrous cycle.

In Vivo. 2015. 29(1):p.17-22.

URL:<http://iv.iiarjournals.org/content/29/1/17.long> 査読有り

- ⑦ 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 $\beta$ .  
EMBO J. 2015 Apr 15;34(8):1042-55.  
doi: 10.15252/embj.201489897.  
査読有り
- 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. 2015 Feb 17;10(2):e0117775.  
doi: 10.1371/journal.pone.0117775.  
eCollection 2015.  
査読有り
- ⑨ Sadamura-Takenaka Y, Ito T, Noma S, Oyama Y, Yamada S, Kawahara K, Inoue H, Maruyama I.  
HMGB1 promotes the development of pulmonary arterial hypertension in rats.  
PLoS One. 2014 Jul 17;9(7):e102482.  
doi: 10.1371/journal.pone.0102482.  
eCollection 2014.  
査読有り

[学会発表] (計10件)

- ① 第103回日本獣医循環器学会  
全血血栓形成観測システムT-TASを用いた心房細動モデル犬の心房血および末梢血における血栓形成能の経時的変化.  
平尾大樹、山田修作、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹、岩永朋子、福島隆治。  
札幌 2015. 12. 20.
- ② 第103回日本獣医循環器学会。  
T-TASを用いたイヌの心房細動時における急性期の血液凝固能の評価  
山田修作、平尾大樹、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、岩永朋子、三浦直樹、福島隆治。  
札幌 2015. 12. 20.
- ③ 第103回日本獣医循環器学会  
膝炎と肺高血圧症を併発した犬の全血血栓形成観測システムによる血小板&凝固能検査の可能性  
岩永朋子、福島隆治、山田修作、平尾大樹、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹  
札幌 2015. 12. 20.
- ④ 第38回日本分子生物学会年会第88回生化学会大会合同大会  
細胞外ヒストンにおけるIL-1 $\beta$ 放出機構の解明  
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲、丸山征郎、川原幸一  
神戸 2015. 12. 1-4.
- ⑤ 第64回九州地区獣医師大会  
リン酸トラセニブとロムスチンの併用療法を試みた多剤耐性リンパ腫の犬5例  
山崎裕毅、Lai Yu-Chang、澤真理子、川畑貴裕、矢吹映、瀬戸口明日香、三浦直樹  
熊本 2015. 10. 16.
- ⑥ 第66回西日本生理学会  
細胞外ヒストンによる炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ 放出機構の解明  
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲、丸山征郎、菊池清志、川原幸一  
久留米 2015. 10. 9.
- ⑦ 第158回日本獣医学会  
低酸素培養条件下の犬リンパ腫細胞における生物学的活性の解析  
山崎裕毅、Lai Yu-Chang、瀬戸口明日香、越野裕子、中市統三、辻本元、三浦直樹  
東京 2015. 9. 8.
- ⑧ 第13回日本獣医がん学会。  
縦隔型T細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の1例。  
山崎裕毅、川畑貴裕、澤真理子、Lai Yu-Chang、矢吹映、三浦直樹、桃井康行。  
東京 2015. 7. 5.
- ⑨ International Work Shop Symposium on Life Science  
EXTRACELLULAR HISTONES ACTIVATE IL-1 $\beta$  PRODUCTION IN MACROPHAGES.  
Kae Oike, Ryota Katsuno, Yasuma Fujimoto, Tetsu Yasuda, Satoshi Noma, Takashi Ito, Salunya Tancharoen, Ikuro Maruyama, Ko-ichi Kawahara

Osaka 2014. 11. 16

- ⑩ 第36回日本血栓止血学会学術集会  
新規致死性因子ヒストンは炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ を放出する  
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲  
平井光、丸山征郎、川原幸一  
大阪 2014. 5. 29-31

## 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・大学院医歯学総合研究科・  
特任教授  
研究者番号：20082282

三浦 直樹 (MIURA, Naoki)  
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・  
准教授  
研究者番号：80508036

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