

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861531

研究課題名(和文)なぜ低親和性抗-ヒストンH1モノクローナル抗体が敗血症の治療効果を有するのか？

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of low-affinity anti-histone H1 monoclonal antibody that rescues mice from lethal endotoxin shock

研究代表者

島田 弥生 (Shimada, Yayoi)

城西国際大学・大学共同利用機関等の部局等・研究員

研究者番号：70439024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエンドトキシンショックからマウスを救命する低親和性抗-ヒストンH1モノクローナル抗体(C93-3)について、ヒストンH1以外の抗原を同定し、作用機序を解明することを目的とした。C93-3は α -actinin 1、 α -actinin 4、nucleolin、hnRNP U、DNAを抗原として認識する多反応性抗体だった。市販の抗-DNAモノクローナル抗体をエンドトキシンショックモデルに投与した結果、生存率の向上が認められた。この結果から、C93-3は細胞外DNAを捕捉することで炎症反応を抑制する可能性が示唆された。細胞外DNAの捕捉は重症敗血症の治療において有効な手段となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Anti-histone H1 monoclonal antibody (mAb) C93-3 has a low-affinity for histone H1 and rescues mice from lethal endotoxin shock. The purposes of this study were to identify other antigens of C93-3 and investigate its mechanism. We found that C93-3 is polyreactive and binds to α -actinin 1, α -actinin 4, nucleolin, hnRNP U and DNA. Administration of commercial anti-DNA mAb to mice underwent endotoxin shock improved survival rate. This result suggests that C93-3 suppresses inflammation by capturing extracellular DNA. Therefore, capturing extracellular DNA may be a potential treatment against severe sepsis.

研究分野：分子生物学

キーワード：抗-ヒストンH1抗体 抗-DNA抗体 多反応性抗体 抗体医薬 敗血症

1. 研究開始当初の背景

全世界で年間 3150 万人が敗血症を発症し、重症化した 1940 万人のうち 530 万人が死亡するという報告がある。世界的に患者数、死亡者数が多いにもかかわらず、敗血症の根本的治療に有効な治療薬は存在しない。敗血症の症状が複雑であることが治療薬開発の妨げとなっているのである。現在の治療は、抗菌薬の投与、輸液、血液浄化といった補助的な治療を組み合わせで行われている。有効な治療薬の誕生が世界的に熱望されている。

我々は、抗-ヒストン H1 ポリクローナル抗体が臓器移植モデル動物において急性拒絶反応を抑制することや、樹状細胞の活性化を抑制することなど、免疫応答を抑制する能力を有することを報告してきた。この抗-ヒストン H1 ポリクローナル抗体の作用機序を詳細に解析するために、我々はいくつかの抗-ヒストン H1 モノクローナル抗体を作製した。このうち C93-3 と名付けられたモノクローナル抗体は、ヒストン H1 への親和性が他のモノクローナルと比べると低く、残念ながら抗-ヒストン H1 ポリクローナル抗体で認められたような能力が認められなかった。しかし、全く予想外なことに、C93-3 はエンドトキシンショックからマウスを救命したのである。生理食塩水投与群の生存率が 20% だったのに対し、C93-3 投与群の生存率は 70% だった(図 1)。ヒストン H1 に高い親和性を示すモノクローナル抗体についても同様の実験を行ったが、救命効果は認められなかった。

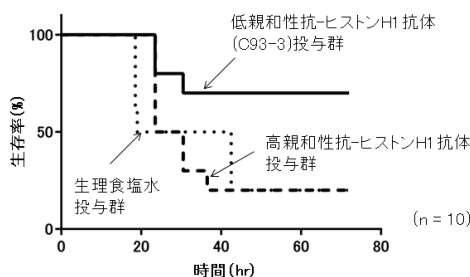


図1 エンドトキシンショックモデルマウスの生存率の推移

この結果から、C93-3 はマウスの体内でヒストン H1 とは異なるタンパク質を抗原として認識する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、エンドトキシンショックからマウスを救命する低親和性抗-ヒストン H1 モノクローナル抗体 C93-3 の作用機序を明らかにし、治療薬開発のために必要な基礎的データを得ることを目的とした。

研究期間内に、以下の研究項目に取り組んだ。

- (1) C93-3 が認識する抗原の同定。
- (2) C93-3 の作用細胞や作用機序の推定および検証。

3. 研究の方法

- (1) C93-3 が認識する抗原の同定

エンドトキシンショックマウスの血漿を用いた抗原同定

Balb/c マウス (雄、7 週齢) に、大腸菌 O127:B8 のリポ多糖 (LPS) を 20 mg/kg 投与した。投与前 (0 hr)、投与後 2、8、16 時間に血液を採取し、血漿を調製した。血漿 0.5 μl を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。ニトロセルロースメンブレンにタンパク質をプロットし、ピオチン標識した C93-3 を用いてウェスタンブロットティングを行った。コントロールとして、ピオチン標識したマウス IgG1 アイソタイプコントロール抗体を用いた。

Balb/c マウス脾細胞のタンパク質画分を用いた抗原同定

Balb/c マウス (雄、5-9 週齢) から脾細胞を調製した。RIPA バッファーで脾細胞を溶解し、遠心分離後、上清を細胞ライセートとした。また、Plasma Membrane Protein Extraction Kit (BioVision) を用いて、サイトゾル、膜タンパク質、細胞膜タンパク質を調製した。調製したタンパク質画分を等電点電気泳動と SDS-PAGE による二次元電気泳動で分離した。C93-3 を用いてウェスタンブロットティングを行った。コントロールとして、マウス IgG1 アイソタイプコントロール抗体を用いた。

RAW264.7 のタンパク質画分を用いた抗原同定

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 から前述のと同様に、タンパク質画分を調製し、C93-3 を用いてウェスタンブロットティングを行った。

上記 ~ において、C93-3 が特異的に反応したスポットを質量分析し、得られた質量スペクトルをクエリーとしてデータベース検索を行い、タンパク質を同定した。

C93-3 と DNA の結合を調査

DNA coating solution (Thermo Scientific) を用いて、終濃度 5 μg/ml のサケ 1 本鎖 (ss)

DNA、2本鎖(ds)DNAを96ウェルプレートにコーティングした。C93-3の希釈系列をウェルに加えた。Enzyme-linked immunosolvent assay (ELISA)法を用いて、固相化したDNAに対するC93-3の結合を測定した。

(2)C93-3の作用細胞や作用機序の推定および検証

nucleolinが関与する作用機序の検証

<腹腔マクロファージ細胞表面へのC93-3の結合を調査>

Balb/cマウス(雄、5-9週齢)から腹腔細胞を調製し、60mmディッシュで1時間培養した。浮遊細胞を洗い流し、接着した細胞を腹腔マクロファージとした。腹腔マクロファージをC93-3および7-AADで染色した。フローサイトメトリーを用いて、生きているマクロファージ(7-AAD陰性細胞)をゲーティングし、表面に結合したC93-3を測定した。

<腹腔マクロファージ細胞表面nucleolinに対するC93-3の結合を調査>

腹腔マクロファージの細胞膜タンパク質を、Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific)を用いて調製した。細胞膜タンパク質をSDS-PAGEし、C93-3、抗-nucleolin抗体でウェスタンブロッティングを行った。両抗体のシグナルを比較した。

<LPSによる腹腔マクロファージの活性化をC93-3が抑制するか調査>

腹腔マクロファージ(1×10^5 cells/ウェル)を96ウェルプレートに加えた。終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ のC93-3、マウスIgG1アイソタイプコントロール抗体を加え、30分間培養した。終濃度10 ng/ml のLPSを加え、4時間培養した。培養上清を回収し、マクロファージの活性化に伴って産生される炎症性サイトカインTNF- α 、IL-6の濃度を測定した。

細胞外DNAが関与する作用機序の検証

<抗-DNA抗体の救命効果の調査>

固相化したssDNAおよびdsDNAに対する反応が、C93-3と同程度である市販の抗-DNA抗体を選定した。Balb/cマウス(雄、7週齢)に、選定した抗-DNAモノクローナル抗体(サブクラスIgG2b)またはマウスIgG2bアイソタイプコントロール抗体を8 mg/kg 投与した。30分後、LPSを10 mg/kg 投与してエンドトキシンショックを誘導した。LPS投与から6時間後に、再度抗-DNAモノクローナル抗体、マウスIgG2bを8 mg/kg 投与し、72時間までマウスの生存時間を記録した。

<細胞外ヌクレオソームによる好中球の活性化>

Balb/cマウス(雄、7週齢)から骨髓細胞を採取し、密度勾配遠心法によって好中球を調製した(Ly6G $^+$ 、CD11b $^+$ 細胞の割合は $>80\%$)。好中球(1×10^5 cells/ウェル)を96ウェルプレートに加えた。HeLa細胞由来モノヌクレオソーム(EpiCypher)を終濃度5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ となるよう加え、一晚培養した。培養上清を回収し、好中球の活性化に伴って産生されるケモカインMIP-2の濃度を測定した。

4. 研究成果

(1)C93-3が認識する抗原の同定

エンドトキシンショックマウスから経時的に採取した血漿、マウス脾細胞およびマウスマクロファージ様細胞株RAW264.7のタンパク質画分を電気泳動で分離し、ウェスタンブロッティングを用いてC93-3の抗原を調査した。

エンドトキシンショックマウスの血漿を用いた抗原同定

コントロールと比較して、C93-3特異的なシグナルは認められなかった。血漿中には、この方法で検出可能なC93-3の抗原は認められなかった。

Balb/cマウス脾細胞のタンパク質画分を用いた抗原同定

C93-3は細胞ライセートおよびサイトゾルにおいて、約120 kDa (pI 5-6.5)、約100 kDa (pI 5-6.5)のスポット群と反応した(図2)。質量分析の結果、それぞれheterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)とnucleolinであると同定された。

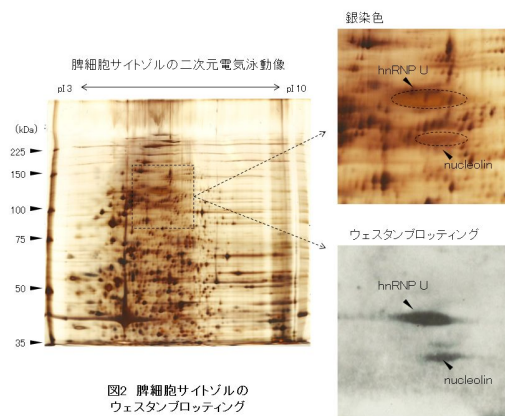


図2 脾細胞サイトゾルのウェスタンブロッティング

RAW264.7 のタンパク質画分を用いた抗原同定

C93-3 は膜タンパク質および細胞膜タンパク質において、約 100 kDa (pI 5) のスポットと反応した (図 3)。質量分析の結果、 α -actinin 1、そのアイソフォームである α -actinin 4 であると同定された。

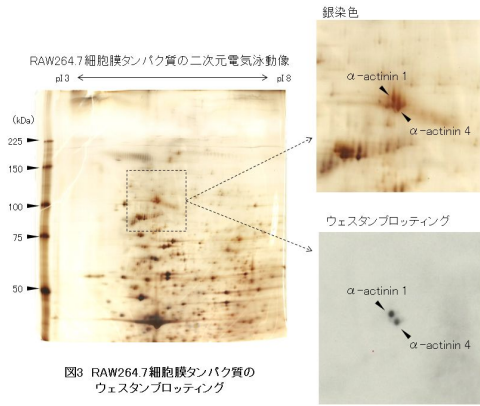


図3 RAW264.7細胞膜タンパク質のウェスタンブロット

α -actinin 1 および 4、nucleolin、hnRNP U のアミノ酸配列には相同性が認められなかった。C93-3 は構造の異なる複数の抗原に結合する多反応性を示した。

C93-3 と DNA の結合を調査

抗-DNA 抗体は自己免疫疾患の病態マーカーとして有名であり、その中には α -actinin 等の全く構造の異なる物質を抗原として認識する多反応性抗体の存在が知られている。そこで、C93-3 が DNA を抗原として認識するかどうか調査した。その結果、C93-3 は ssDNA および dsDNA を抗原として認識した (図 4)。

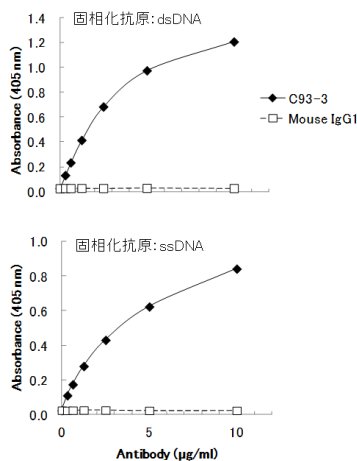


図4 DNAに対するC93-3の結合

この結果から、C93-3 は多反応性を示す抗-DNA 抗体のような抗体であることが示唆された。

(2) C93-3 の作用細胞や作用機序の推定および検証

nucleolin が関与する作用機序の検証

nucleolin は RNA のプロセッシングに関与するタンパク質である。近年、マクロファージの細胞表面上に存在し、LPS によるマクロファージの活性化に関与することが報告された。C93-3 がマクロファージ細胞表面の nucleolin を認識することで、LPS による活性化を抑制する可能性が考えられた。この可能性を検証した。

腹腔マクロファージを C93-3 と 7-AAD で染色し、フローサイトメトリーで測定した。その結果、C93-3 は生きているマクロファージの細胞表面に結合することを確認した。

マクロファージ細胞表面タンパク質を C93-3 と抗-nucleolin 抗体でウェスタンブロットティングし、シグナルを比較した。その結果、C93-3 で認められた複数のシグナルのうち、100 kDa のシグナルが抗-nucleolin 抗体のシグナルと一致した。このことから、C93-3 は nucleolin を介してマクロファージ表面に結合することが示唆された。

C93-3 存在下において、LPS でマクロファージを刺激し、培養上清中の TNF- α 、IL-6 濃度を測定した。その結果、C93-3 は TNF- α 、IL-6 の産生を抑制しなかった (図 5)。

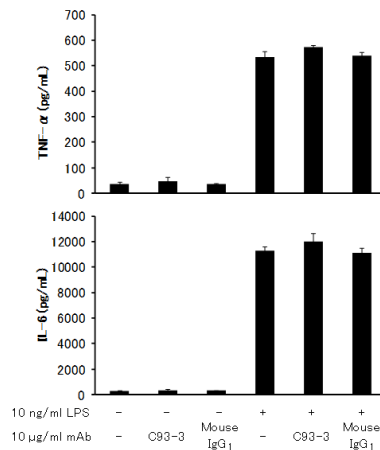


図5 LPSによる腹腔マクロファージの活性化に対するC93-3の影響

これらの結果から、C93-3 は nucleolin を介してマクロファージ表面に結合するが、LPS による活性化を抑制しないことが示唆された。

細胞外 DNA が関与する作用機序の検証
<抗-DNA 抗体の救命効果の調査>

DNA は Toll-like 受容体のリガンドとして働き、炎症反応を誘導することが知られている。加えて、血液中の細胞外 DNA の濃度が敗血症の重症度と相関することが報告がされている。C93-3 は細胞外 DNA を捕捉することで、炎症反応を抑制する可能性が考えられた。この可能性を検証した。

抗-DNA 抗体をエンドトキシンショックモデルマウスに投与し、救命効果を評価した。その結果、72 時間後の生存率は、抗-DNA 抗体投与群で 60%、コントロール抗体投与群で 20%だった。抗-DNA 抗体はエンドトキシンショックからマウスを救命した。この結果から、C93-3 は細胞外 DNA を捕捉することで炎症反応を抑制し、エンドトキシンショックからマウスを救命する可能性が示唆された。

<細胞外ヌクレオソームによる好中球の活性化を C93-3 が抑制するか調査>

ヌクレオソームはヒストンタンパク質と DNA からなる。血中のヌクレオソーム濃度が敗血症の重症度と相関し、細胞外のヌクレオソームが好中球を活性化することが報告されている。また、敗血症において過度の好中球の活性化は組織傷害をもたらす。これらの報告から、C93-3 が細胞外ヌクレオソームを捕捉することで、好中球の活性化を抑制し、付随する炎症反応を抑制する可能性が考えられた。この可能性を検証した。

まず、既報の通り、ヌクレオソームによる好中球の活性化が再現されるかどうか調査した。マウス骨髄細胞から調製した好中球に終濃度 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HeLa 細胞由来モノヌクレオソームを加えて培養し、培養上清中のケモカイン MIP-2 の濃度を測定した。その結果、ヌクレオソームは MIP-2 の産生を誘導しなかった。つまり、ヌクレオソームは好中球を活性化しなかった。既報の再現性を確認できなかったため、C93-3 の評価には至らなかった。

本研究において、C93-3 は多反応性を示す抗-DNA 抗体のような抗体であり、細胞外 DNA を捕捉することで炎症反応を抑制する可能性が示唆された。細胞外 DNA の捕捉は、重症敗血症の治療に有効な手段となる可能性がある。

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) Toru K., Kuei-Chen C., Masashi I., Yayoi S., Naoya O., Takeshi G., Shuji S., Shigeru G., Toshiaki N., Seiji K., Yuki T., Norio S., Takayuki N. and Seigo K.

A Novel Anti-histone H1 Monoclonal Antibody, SSV Monoclonal Antibody, Improves Lung Injury And Survival In A Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation.

BioMed Research International. 2015; 2015:1-10. (査読あり)

DOI: 10.1155/2015/491649

[学会発表](計2件)

島田 弥生

エンドトキシンショックからマウスを救命する多反応性モノクローナル抗体の作用機序の調査

第 88 回日本生化学会大会

2015 年 12 月 2 日

神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

島田 弥生

敗血症治療効果を有する抗-ヒストン H1モノクローナル抗体の交差抗原の探索、第 87 回日本生化学会大会

2014 年 10 月 18 日

国立京都国際会館(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 弥生 (SHIMADA YAYOI)

城西国際大学・かずさ創薬研究センター・研究員

研究者番号: 70439024