

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08999

研究課題名(和文) 遺伝子組換えタンパク質によるマクロファージ機能の超制御機構とその臨床応用

研究課題名(英文) High-order mechanism for regulating immune function of macrophages using a new recombinant protein and its clinical application

研究代表者

池本 正生 (Ikemoto, Masaki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授

研究者番号：80144385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに対する遺伝子組み換えタンパク質(hMIKO-1, -1a, -1b, -1c)の作製に成功した。hMIKO-1はラットにDSSで誘導した潰瘍性大腸炎の発症を劇的に抑制した。本タンパク質はマクロファージの核内まで移行し、炎症性サイトカインmRNAの発現を有意に抑制した。この結果は、マクロファージにおけるNF-kappaB経路を阻害している可能性が高いと考えられる。

一方、単球性白血病細胞をPMAで分化させたヒトマクロファージに対してhMIKO-1が細胞質を介して核内に移行することを確認した。その他、間質性肺炎や強皮症(いずれも難病指定)にも極めて有効に作用することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hMIKO-1は核内における炎症性サイトカインmRNAの発現を強く阻害すること、細胞質で産生された炎症性サイトカインを細胞質内で複合体を形成することにより、炎症誘導過程を阻害すると考えられる。これはToll-like receptor 4を介する経路を阻害している可能性が高いことから、潰瘍性大腸炎だけでなくマクロファージの異常活性化を原因とする他の炎症性疾患に対しても有効と考えられる。事実、間質性肺炎や強皮症においてもその有効性が確認された。これらの成果は難病の原因解明に貢献でき、その社会的意義は大変大きい。また、hMIKO-1のアミノ酸配列の解析は新しいタンパク質科学の発展に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Recombinant human MIKO-1 and its derivatives (-1a, -1b, -1c) were newly developed by gene technology. hMIKO-1 strongly suppressed the onset of experimental colitis induced with 5% DSS in rats. hMIKO-1 intracellularly entered into macrophages and further migrated inside their nucleus. It was strongly suggested that hMIKO-1 could inhibit the pathway of NF-kappa B by negatively regulating the expression of inflammatory cytokines's mRNAs.

On the other hand, we confirmed that hMIKO-1 also entered into macrophages and further migrated inside the nucleus. It was also noteworthy that hMIKO-1 strongly suppressed the onset of indirect pneumonia and systemic sclerosis in mouse.

研究分野：臨床生化学，臨床免疫学

キーワード：マクロファージ 炎症性サイトカイン 間質性肺炎 強皮症 組換えタンパク質 難病 免疫複合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎 (UC) の患者数が急激に増加しており、社会問題となりつつある。その発症原因として、ミュータンス菌の糖鎖を原因とする説、硫化水素産生菌の増加による説 (Slee EA et al., *Cell Death and Differ* 6, 1999; Foell D et al., *Gut* 58, 2009), Th17 細胞が産生する IL-17A による説が提唱されているが、いずれの説も決定的でない。その中で、最近、腸内常在細菌による TLR 4 を介したマクロファージの異常活性化説が提唱され、注目されている (Yen D et al., *J Clin Invest* 116, 2006; Harrington LE et al., *Nat Immunol* 6, 2005; Yoshino et al., *Inflamm Bowel Dis* 16, 2010)。すなわち、大腸組織におけるマクロファージが腸管腔内の微生物あるいはその成分によって異常に活性化され、その結果、本免疫細胞から炎症性サイトカインが過剰に分泌され、大腸、とくに直腸組織から炎症が誘導されるとする説である。このような学術的背景から、S100 タンパク質 (S100A8 及び S100A9) はマクロファージの主要なタンパク質であることから、本免疫細胞の機能制御に深く関わっている可能性が強く示唆される。したがって、本タンパク質の免疫学的機能を分子レベル及び遺伝子レベルで明らかにすることが潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の原因究明、ひいては自己免疫性疾患の病因解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

最近、我々は骨髄系免疫細胞、とくにマクロファージの異常活性が UC の発症に深く関係していること、マクロファージが産生する S100A8 及び S100A9 が CD68 を介してマクロファージ機能を制御することを発見した。このように S100 タンパク質はマクロファージ機能の制御にとって重要な因子であるが、分子レベルの作用機序は未詳である。そこで、両タンパク質のアミノ酸配列を基調として独自に考案したリコンビナントタンパク質 (rMIK0-1 及びその誘導体) を作製し、この rMIK0-1 のマクロファージに対する反応性を検証することによって S100 タンパク質の活性中心を推定し、rMIK0-1 のマクロファージ機能に対する制御性タンパク質としての制御機構を解明すること、炎症性腸疾患の予防と治療に向けた rMIK0-1 の臨床的有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) ラット MIK0-1 (rMIK0-1) 及びヒト MIK0-1 (hMIK0-1) の作製

S100 タンパク質を基調として、それぞれのアミノ酸配列の一部を組み替えた 4 種類 (rMIK0-1~rMIK0-4) のリコンビナントタンパク質の一次構造を示した (組み替えた一部の一次構造は未公開: グレー表示)。

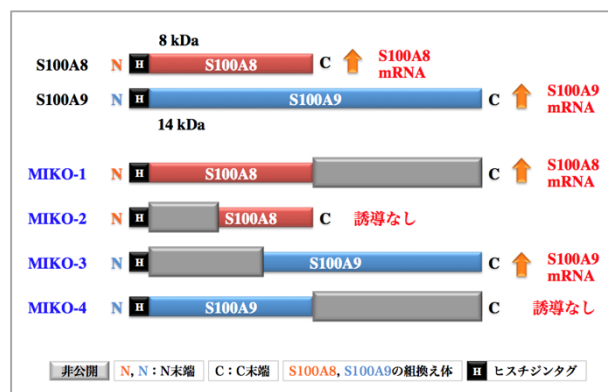


図1: rMIK0-1 の一次構造と生理活性

2) rMIK0-1 のマクロファージに対する反応性の検討

(1) rMIK0-1 の遺伝子組換え体 (大腸菌) はすでに保有している。この大腸菌体内から rMIK0-1 を Ni-アガアロースカラムを用いて部分精製し、最終的に DEAE カラムで精製する (純度 98%以上)。FITC または Texas Red (TR) で蛍光標識した rMIK0-1 をマクロファージに作用させ、標識した rMIK0-1 が細胞内に取り込まれるかどうかを、蛍光顕微鏡 (KEYENCE BIOREBO BZ-9000) で観察した (Z スタック解析)。次に、蛍光標識 rMIK0-1 とマクロファージ内の NF- κ B, β -アクチン、ゴルジ体などの蛍光免疫染色により、細胞内局在性を確認する。その結果から、rMIK0-1 が細胞質から核内へ輸送される可能性と、その経路を考察する。

(2) rMIK0-1 が NF- κ B 及び MAPK 活性化経路関連タンパク質である p65, p38, JNK のリン酸化を抑制するかどうかを検討し、本タンパク質の超制御機構をタンパク質及び遺伝子レベルで解析する。

(3) これまでに、rMIK0-1 がマクロファージのエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが明らかになっている。そこで、ラット (WT) の腹腔マクロファージを用いて、FITC 標識 rMIK0-1 の細胞内への取り込みとその局在性を検証する。また、ビオチン標識 rMIK0-1 を一定時間マクロファージに作用させ、その後、細胞質内タンパク質と核内タンパク質を分離抽出し、

それぞれの分画に含まれるビオチン標識 rMIKO-1 をストレプトアビジン-HRP により検出することにより, rMIKO-1 の細胞内挙動を明らかにする.

3) rMIKO-1 による炎症性サイトカイン mRNA の発現制御機構の解析 (in vitro)

すでに, rMIKO-1 が活性化マクロファージのエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ, さらに核内に移行する可能性の高いことを見出している (図 1). その結果として, 細胞質内あるいは核内に移行した rMIKO-1 が何らかの機序により炎症性サイトカイン mRNA の産生・誘導を抑制する可能性が強く示唆される. すなわち, 1) MIKO-1 が細胞質内でフリーの NF- κ B を産生する過程を阻害する可能性, 2) rMIKO-1 がフリーの NF- κ B と複合体を形成することによって NF- κ B の核内への移行を阻害している可能性, 3) 核内に移行した rMIKO-1 が NF- κ B モチーフに存在するプロモーターに結合し, 情報伝達不可の状態にしている可能性などが考えられる. 最近, rMIKO-1 でマクロファージを処理したとき, この免疫細胞の細胞質内において, フリーの NF- κ B が核内に移行しない可能性の高い画像を蛍光免疫二重染色より観察している. この事実は, rMIKO-1 が細胞質内で炎症誘導情報伝達経路の一部を阻害している可能性を強く示唆している. そこで, 細胞質内及び核内情報伝達因子に対する各種阻害剤などを用いて, rMIKO-1 の炎症抑制機能のメカニズムを in vitro の系で明らかにする.

4. 研究成果

1) S100A8 および S100A9 の一次構造解析

S100A8 及び S100A9 はそれぞれ S100A8 mRNA 及び S100A9 mRNA の発現をオートクライン的に誘導することを, すでに明らかにした. しかし, それらの誘導を規定するアミノ酸配列の活性中心は未詳であった. そこで, S100A8 および S100A9 の一次構造を参考に, 遺伝子組換えタンパク質, すなわち S100A8 に S100A9 の C 末端から 24 アミノ酸残基を付加したハイブリッドペプチド (rMIKO-1), S100A8 の N 末端から 20 アミノ酸残基を S100A9 の 20 アミノ酸残基と入れ替えたペプチド (rMIKO-2), 同様に, S100A9 の N 末端から 20 アミノ酸残基を S100A8 の 20 アミノ酸残基と入れ替えたペプチド (rMIKO-3), S100A9 の C 末端から 24 アミノ酸残基を切断したペプチド (rMIKO-4) を作製し, それぞれのマクロファージに対する反応性を遺伝子レベルで検討した.

その結果, これら組み換えタンパク質でマクロファージを刺激し, S100A8 及び S100A9 mRNA の変化を観察した. 図 1 (右端の赤字) に示すように, rMIKO-1 は S100A8 mRNA の産生・分泌を誘導するが, rMIKO-2 は誘導しないこと, rMIKO-3 は S100A9 mRNA の産生・分泌を誘導するが, rMIKO-4 は誘導しないことが明らかになった. rMIKO-1 は S100A8 mRNA を 10 倍以上, rMIKO-3 は S100A9 mRNA を 3 倍程度選択的に活性化したことから, S100A8 の N 末端側領域と S100A9 の C 末端側領域が重要な活性領域であることが判明したことから, 我々はハイブリッドタンパク質である rMIKO-1 は高機能な抗炎症性タンパク質であると考えられた.

2) rMIKO-1 のマクロファージへの結合及び細胞内挙動と核内移行メカニズムの解析

rMIKO-1 のマクロファージに対する分子挙動に関する研究から, 本タンパク質は細胞質を介して核内に移行する特殊なタンパク質であった (図 2). この挙動が免疫学的にどのような意味を有するのか, 現時点で詳細には明らかでない. しかし, これまでの結果から, rMIKO-1 は異常なマクロファージに結合し, さらに細胞質内の β -アクチンによって核内に輸送され潰瘍性大腸炎に伴う炎症性変化を制御している可能性が高い. すなわち炎症性サイトカイン mRNA の発現を強く抑制していると考えられる. 事実, MIKO-1 が細胞内および核内に存在すること, また MIKO-1 と NF- κ B との複合体が存在する可能性を明らかにしている. さらに, MIKO-1 は細胞質内において炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) と複合体を形成することによって炎症を抑制する可能性がある. rMIKO-1 が核内に移行する詳細なメカニズムは明らかになっていないが, 核内において rMIKO-1 が炎症に関する情報伝達経路を阻害している可能性が極めて高いと考えられ, 非常に注目された. そのメカニズムの仮説を図 3 に示した.

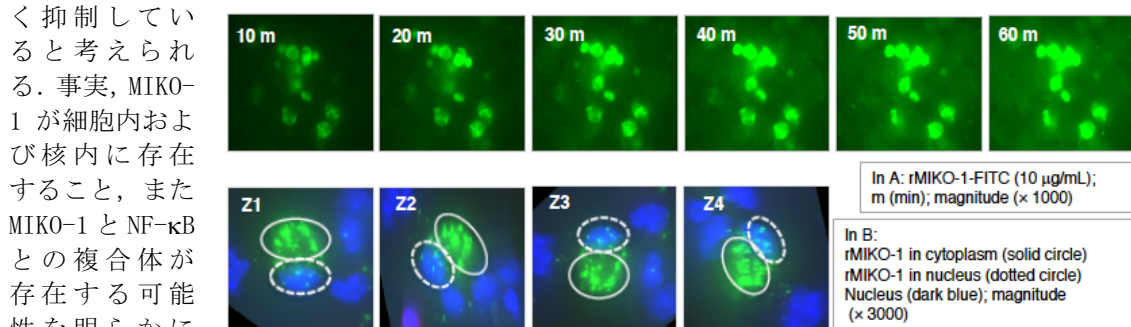


図 2 : 小円 (核内), 大円 (細胞質) 内

細胞質内において炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) と複合体を形成することによって炎症を抑制する可能性がある. rMIKO-1 が核内に移行する詳細なメカニズムは明らかになっていないが, 核内において rMIKO-1 が炎症に関する情報伝達経路を阻害している可能性が極めて高いと考えられ, 非常に注目された. そのメカニズムの仮説を図 3 に示した.

一方、MIKO-1 の潰瘍性大腸炎抑制効果を遺伝子レベルで検討した。これまでに、S100A8 および S100A9 がオートクライン的に S100A8 mRNA および S100A9 mRNA の発現を誘導することは明らかになっている。我々は従来から S100A8 は抗炎症性機能を有するタンパク質であることを提言してきたが、MIKO-1 が S100A8 より 10 倍以上の S100A8 mRNA 発現効果を有する事実によって示されるように、MIKO-1 は想像以上の抗炎症性機能を有する特殊なハイブリッドタンパク質の開発に成功した。この結果は潰瘍性大腸炎の治療薬開発に繋がる重要な成果である。

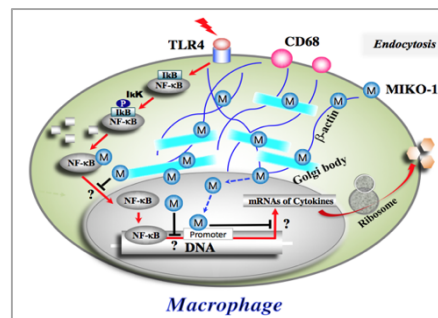


図3：rMIKO-1 の作用機序の仮説

3) MIKO-1 の抗炎症性機能の組織学的検討

MIKO-1 の抗炎症性機能を *in vivo* の系で検証した。硫酸化デキストラン (DSS) で潰瘍性大腸炎 (UC) を誘導したラットに MIKO-1 を 0.2 及び 0.6 mg/day/rat の割合で腹腔内投与し、その抑制効果についてラット大腸 (とくに直腸部位) を用いて組織学的に検討した。その結果、大腸の炎症は MIKO-1 の投与量にほぼ比例して抑制されていた (図4)。また、大腸の長さを測定したところ、DSS のみを投与したラットの大腸は明らかに短く縮んでいた (12.5cm)。それに対して MIKO-1 投与群ラットの大腸長さは M0.2 (17.4cm) 及び M0.6 (17.5cm) であり、ともに正常群 (17.5cm) とほとんど差はなかった。これらの事実は、ラット腹腔内に投与した MIKO-1 の炎症抑制効果を間接的に示していると思われる。

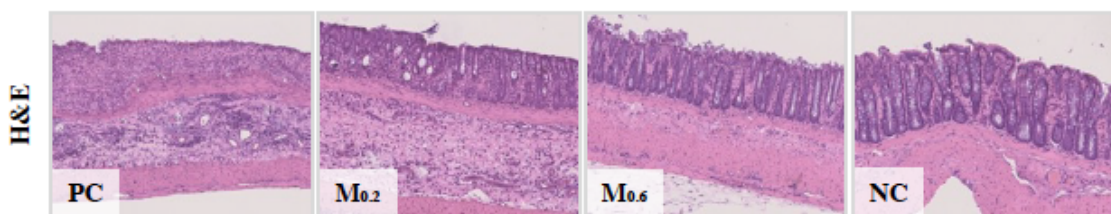


図4 MIKO-1 処理ラット大腸組織の HE 染色

4) hMIKO-1 とその誘導体の作製及び免疫学的機能解析

ラット MIKO-1 及びその誘導体の免疫学的機能を解析したところ、MIKO-1 が最も注目された。そこで、ラットの MIKO-1 と同様に、hS100A8 の C 末端に hS100A9 の C 末端から 21 アミノ酸残基に相当するペプチドを付加した遺伝子組換えタンパク質 (hMIKO-1) を作製した。次に、hMIKO-1 の誘導体 (hMIKO-1a, hMIKO-1b, hMIKO-1c) を作製し、それぞれのマクロファージに対する免疫学的反応性をタンパク質及び遺伝子レベルで検討した。その結果、ラットの MIKO-1 とほとんど同様の結果が得られた。すなわち、いずれもラットマクロファージに結合、さらに細胞質を介して核内に移行すること (図5：hMIKO-1c <赤>; β-アクチン <緑>; 核 <青>)、炎症性サイトカイン mRNA の発現を強く抑制すること、S100A8 mRNA の発現を強く誘導すること、TGF-βや IL-10 など抗炎症性サイトカイン mRNA の発現を増加させることを確認した。さらに、THP-1 細胞 (ヒト単球性白血病細胞) を PMA で分化させたマクロファージ様細胞を用いた実験においても、核内に移行している様子を視覚的に確認することができた。その中でも、核内へ移行した hMIKO-1c は hMIKO-1 よりも多く、より効果的に作用する制御性因子と考えられた。hMIKO-1c は hMIKO-1 の C 末端から 11 アミノ酸残基分だけ短いことから、この短いペプチドは hMIKO-1c の機能発現にとって重要なアミノ酸配列と推察された。新しいハイブリッドタンパク質である hMIKO-1c の免疫学的高機能はその三次元高次構造に依存している可能性がある。

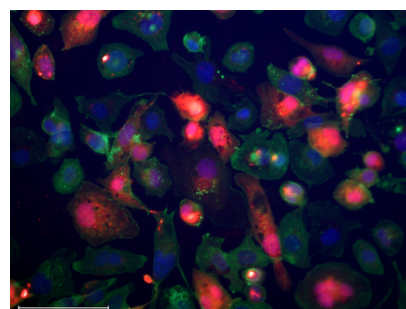


図5 hMIKO-1 のマクロファージ様細胞 (THP-1) への取り込み

一方、hMIKO-1 は潰瘍性大腸炎モデルだけでなく、間質性肺炎や強皮症など自己免疫性疾患モデルマウスを用いた動物実験においても、炎症反応を劇的に抑制した (大阪医科大学との共同研究)。現在、その詳細なメカニズムは明らかでないが、その解明に取り組んでいる。いずれにしても、ラット MIKO-1 と同様な結果が得られたことは hMIKO-1 がヒトの炎症性疾患、すなわち潰瘍性大腸炎や間質性肺炎など自己免疫性疾患の治療にも有効に作用することを強く示唆している。hMIKO-1 及び hMIKO-1c のマクロファージに対する詳細な作用機序は明らかになっていない。

が、将来的には、hMIKO-1，とくに hMIKO-1c は自己免疫性疾患の発症を効果的に抑制しうる免疫学的バイオ製剤としての意義を有すると思われる。

以上、我々が開発したハイブリッドタンパク質である rMIKO-1 及び hMIKO-1 は免疫学的に高機能を有する抗炎症性タンパク質であることが判明した。本タンパク質が潰瘍性大腸炎だけでなく間質性肺炎など自己免疫性疾患に対しても有効に作用する可能性が示されたことは、予想外の結果であった。本タンパク質の詳細な作用機序は十分に解明されていないが、おそらく異常に活性化されたマクロファージからの炎症性サイトカインの発現を効果的に抑制している可能性が非常に高いと考えられた。したがって、hMIKO-1 はマクロファージの異常を原因とする炎症性疾患の予防と治療に対して有効に作用すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohki Okada, Hiroshi Itoh, Masaki Ikemoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Circulating S100A8/A9 is potentially a biomarker that could reflect the severity of experimental colitis in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e03470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kohki Okada, Makoto Okabe, Yuto Kimura, Hiroshi Itoh, and Masaki Ikemoto	4. 巻 50
2. 論文標題 Serum S100A8/A9 as a potentially sensitive biomarker for inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 370-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/labmed/lmz003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohki Okada, Hiroshi Itoh, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi, and Masaki Ikemoto	4. 巻 Vol.41
2. 論文標題 Establishment of S100A8 Transgenic Rats to Understand Innate Property of S100A8 and Its Immunological Role	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 59-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-017-0664-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kohki Okada and Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Identification of serum proteins changed in patients with inflammatory bowel disease by mass spectrometry and their potential as new biomarkers
3. 学会等名 Congress of the Korean Association of Medical Technologists and International Symposium, Korean Society for Clinical Laboratory Science（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 遺伝子組換えタンパク質hMIK0-1の潰瘍性大腸炎抑制効果とその作用機構の解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルラットの大腸組織において変動するタンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における大腸組織中細胞質性炭酸脱水素酵素CA-IIIの臨床的意義について
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 マクロファージ機能制御性タンパク質hMIK0-1の潰瘍性大腸炎に対する新しい治療薬としての可能性
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患における補体C3測定の臨床的意義
3. 学会等名 第58回日本臨床化学学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 光貴, 池本 正生
2. 発表標題 炎症性腸疾患における 2-マクログロブリン測定の臨床的意義
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 光貴, 伊藤 洋志, 池本 正生
2. 発表標題 遺伝子組み換えタンパク質によるマクロファージ機能の超制御機構とその臨床応用
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohki Okada, Shunsuke Sekiya, Kohsuke Doi, and Masaki Ikemoto
2. 発表標題 Serum S100A8/A9 is a sensitive biomarker for inflammatory bowel diseases
3. 学会等名 The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡田光貴, 池本正生
2. 発表標題 S100A8トランスジェニックラットの樹立とその免疫学的意義
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 機能性ペプチド, それを用いた大腸炎用医薬およびデリバリー剤	発明者 池本 正生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-214434	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 洋志 (Itoh Hiroshi) (20362387)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授 (34204)	
研究 分担者	岡田 光貴 (Okada Kohki) (80747569)	京都橘大学・健康科学部・助教C (34309)	