

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02906

研究課題名(和文)敗血症の病態進行におけるヒストンの相互作用の解明とその応用の研究

研究課題名(英文) Research on the interaction of histones in pathophysiology of sepsis and its application

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：全世界で敗血症の罹患率は増え続けている。敗血症の定義が「生命を脅かす臓器障害」と改定された。この改定にはDAMPsの重要性が示唆される。DAMPsとは臓器障害の細胞から放出され、死へと導く分子である。最近、ヒストンが新規DAMPsと示された。ヒストンH3、H4が細胞傷害、血小板凝集を惹起するからである。しかしながら、ヒストンH2A、H2BがDAMPsとして証明されていない。本研究では、マクロファージ様RAW264.7細胞を用いて、ヒストンH2AとH2BがERK1/2を介してTNF- α の産生を誘導することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の定義が「生命を脅かす臓器障害」と改定された。これはDAMPsの重要性が示唆される。DAMPsとは臓器障害の細胞から放出され、個体死へと導く分子である。最近、ヒストンが新規DAMPsと示された。ヒストンH3、H4が細胞傷害、血小板凝集を惹起するからである。本研究結果では、ヒストンH2A、H2BがDAMPsとして証明された。すなわち、ヒストンのDAMPsとしての機能が解明された。よって、ヒストンにはそれぞれ役割があることが示唆され、新規の治療法の確立につながると確信した。

研究成果の概要(英文)：Recently, histone H3 and H4, are released into the extracellular space during sepsis and act as major mediators of death of an organism and induce platelet activation, suggesting that the extracellular histones may be damage-associated molecular patterns (DAMPs). However, histone H2A and H2B still remain unclear. In this study, the results showed that both histone H2A and H2B significantly induced the release of TNF- α in RAW264.7 cells. Histone H2A and H2B activated ERK1/2, p38MAPK and JNK, respectively. Furthermore, U0126, the inhibitor of ERK1/2 activation, significantly inhibited TNF- α induction by histone H2A and H2B in RAW264.7 cells, but not p38MAPK inhibitor SB203580 and JNK inhibitor SP600125. Therefore, our findings suggest that in the extracellular milieu, the role of Histone H2A and H2B might induce TNF- α via ERK1/2 activation in the tissue-damaged diseases such as sepsis and rheumatoid arthritis.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 DAMPs ヒストン

1. 研究開始当初の背景

先進国、発展途上国に関わらず敗血症患者は世界で2500万人/年、その内800万人が死亡している。これは世界のどこかで3秒に1人が敗血症により死亡している計算になる。したがって、敗血症治療の確立は急務である。

2016年、敗血症の定義が「生命を脅かす臓器障害」と改められた。この改変は、臓器(細胞)障害より漏出するタンパク質群、すなわち Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) が生命を脅かすことからである(J Leukoc Biol. 2009 86, PLoS One. 2013)。DAMPs の中でも注目されているのが細胞内に最も多いヒストンである。

1999年・サイエンス誌に、DAMPs は核内タンパク質の High Mobility Group Box-1 (HMGB1) が敗血症患者で病態の進展に伴い血清で検出された。次に、2009年、エズモンらは、細胞の中で最も多いヒストン(H2A、H2B、H3、H4)のH3、H4が1時間以内で個体死を誘導する。研究代表者らは、ヒストンのH3、H4の封じ込めを播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬であるトロンボモジュリン(商品名リコモジュリン)で証明した(PLoS One. 2013)。このように、DAMPs は細胞障害時に細胞外へ放出され、単独で致死を誘導する最も恐ろしい分子群である。これらの背景により敗血症の定義が改められたと考える。したがって、DAMPs・ヒストンの全容解明、つまり分子の同定、封じ込めは敗血症の新規治療の確立に必須である。

2. 研究の目的

最近、クロマチンの構成要素のヒストン H3 と H4 は、細胞障害時に細胞外へ放出される。ヒストン H3 と H4 は細胞死の主要なメディエーターとして働く。さらに、ヒストン H3 と H4 は血小板活性化と血管内皮細胞の細胞死を誘導する。よって、細胞外ヒストン H3 と H4 はダメージ関連分子パターン(DAMPs: Damage-associated Molecular Patterns)である。しかしながら、DAMPs としての他のコアヒストンモノマー、すなわち H2A と H2B の役割については、未だ解明されていない。よって本研究では、ヒストン H2A と H2B が DAMPs であることを確認するために、マクロファージ様 RAW264.7 細胞において、ヒストン H2A と H2B が炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子(TNF:Tumor Necrosis Factor)- α を誘導するかを検証した。また、そのシグナル伝達の解明も検証した。

3. 研究の方法

ヒストン(H1、H2A、H2B、H3、H4)刺激による TNF- α 放出実験

RAW264.7 細胞を 24well dish に 5×10^5 cell/well 播種した。ヒストン(H1、H2A、H2B、H3、H4)の最終濃度が 300 nM になるようにそれぞれ添加した。16 時間後に培地を回収し、ELISA 法にて TNF- α の放出量を測定した。

H2A、H2B 刺激による TNF- α 放出実験

RAW264.7 細胞を 24well dish に 5×10^5 cell/well 播種した。H2A、H2B の最終濃度が 0、100、300、500 (nM)になるようにそれぞれ添加した。16 時間後に培地を回収し、ELISA 法にて TNF- α の放出量を測定した。

SB20358、U0126、LY294002、SP600125 と H2B 刺激による TNF- α 放出実験

RAW264.7 細胞を 24well dish に 5×10^5 cell/well 播種した。SB20358、U0126、LY294002、SP600125 の各最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように添加した。2 時間後、H2A、H2B 300nM で刺激を 16 時間行った。TNF- α の放出量は ELISA 法にて測定した。

SB20358、U0126、LY294002、SP600125 と H2B 刺激による細胞生存数の検出実験

RAW264.7 細胞を 24well dish に 5×10^5 cell/well 播種した。SB20358、U0126、LY294002、SP600125 の各最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように添加した。2 時間後、H2B 300nM で刺激を 16 時間行った。細胞生存数は WST-8 により測定した。

4. 研究成果

RAW264.7 細胞において、ヒストン H2A と H2B は、TNF- α の放出を有意に誘導した。しかしながら、ヒストン H3 と H4 では TNF- α の放出は見られなかった。ヒストン H2A と H2B は ERK1/2 (Extracellular signal - related kinase 1/2)、p38MAPK、JNK (Jun N-terminal kinase) をそれぞれ活性化した。さらに、RAW264.7 細胞において、ヒストン H2A と H2B による TNF- α の誘導は、ERK1/2 活性化阻害剤の U0126 により有意に抑制された。しかしながら、SB203580 (p38MAPK 阻害剤) と SP600125 (JNK 阻害剤) では見られなかった。さらに、細胞生存数の検出実験より、コントロール (無刺激) と比較して、全く細胞死には影響しなかった。よって、ヒストン H2A と H2B は、ERK1/2 を介して TNF- α を誘導し、DAMPs であると証明した。本研究より、急性 (敗血症)・慢性疾患 (慢性関節リウマチなど) による組織の損傷によって細胞外に放出されたヒストン群 (H3、H4、H2A、H2B) は、それぞれ役割があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kikuchi K, Setoyama K, Tanaka E, Otsuka S, Terashi T, Nakanishi K, Takada S, Sakakima H, Ampawong S, Kawahara KI, Nagasato T, Hosokawa K, Harada Y, Yamamoto M, Kamikokuryo C, Kiyama R, Morioka M, Ito T, Maruyama I, Tancharoen S.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Uric acid enhances alteplase-mediated thrombolysis as an antioxidant.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34220-1.	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 該当する

1. 著者名 Kikuchi K, Setoyama K, Terashi T, Sumizono M, Tancharoen S, Otsuka S, Takada S, Nakanishi K, Ueda K, Sakakima H, Kawahara KI, Maruyama I, Hattori G, Morioka M, Tanaka E, Uchikado H.	4. 巻 19(5)
2. 論文標題 Application of a Novel Anti-Adhesive Membrane, E8002, in a Rat Laminectomy Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051513.	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 該当する

1. 著者名 Lai Yu-Chang, Habiby Gul Habib, Jasing Pathiranaage Chamila Chandana, Rahman Md Mahfuzur, Chen Hui-Wen, Husna Al Asmaul, Kubota Chikara, Miura Naoki	4. 巻 135
2. 論文標題 Bovine serum miR-21 expression affected by mastitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 290 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2020.10.001	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 該当する

1. 著者名 Iwanaga Tomoko, Fukushima Ryuji, Nagasato Tomoka, Maruyama Ikuro, Miura Naoki	4. 巻 33
2. 論文標題 Analysis of blood clotting with the total thrombus analysis system in healthy dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	6. 最初と最後の頁 357 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1040638721991862	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 Yamada Shusaku, Hirao Daiki, Miura Naoki, Iwanaga Tomoko, Kawaguchi Takae, Yoshimura Aritada, Omori Takahiro, Nagasato Tomoka, Maruyama Ikuro, Fukushima Ryuji	4. 巻 68
2. 論文標題 Comparison between blood coagulability in the intra-atrial and peripheral regions during the acute phase after rapid atrial pacing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 137 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0100	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 Rahman Md. Mahfuzur, Lai Yu-Chang, Husna Al Asmaul, Chen Hui-wen, Tanaka Yuiko, Kawaguchi Hiroaki, Miyoshi Noriaki, Nakagawa Takayuki, Fukushima Ryuji, Miura Naoki	4. 巻 20
2. 論文標題 Micro RNA Transcriptome Profile in Canine Oral Melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4832 ~ 4832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194832	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 Nakatomi Kota, Ueno Hikari, Ishikawa Yuto, Salim Ronny, Mori Yuki, Kanemoto Issey, Tancharoen Salunya, Kikuchi Kiyoshi, Miura Naoki, Omori Taketo, Okuda-Ashitaka Emiko, Matsumura Kiyoshi, Imaizumi Hitoshi, Motomiya Yoshihiro, Maruyama Ikuro, Kawahara Ko-Ichi	4. 巻 14
2. 論文標題 TLR4/MD-2 is a receptor for extracellular nucleophosmin 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1397	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中富康太, 董建暉, 金本一誠, Ronny Christiadi Salim, 上野光理, Salunya Tancharoen, 菊池清志, 伊藤隆史, 丸山征郎, 川原幸一
2. 発表標題 細胞外Nucleophosminの受容体は TLR-4である
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hikari Ueno, Kota Nakatomi, Shuto Anan, Salunya Tancharoen, Kiyoshi Kikuchi, Takashi Ito, Ikuro Maruyama, Ko-ichi Kawahara
2. 発表標題 TNF-a induction by Histone H2A and H2B is mediated via ERK1/2 in RAW264.7 cells.
3. 学会等名 International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Nakatomi, Ronny Christiadi Salim, Issey Kanemoto, Hikari Ueno, Dong Jianhui, Salunya Tancharoen, Kiyoshi Kikuchi, Takashi Ito, Ikuro Maruyama, Ko-ichi Kawahara.
2. 発表標題 The extracellular Nucleophosmin Receptor is TLR-4
3. 学会等名 International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	丸山 征郎 (Maruyama Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	
研究分担者	今泉 均 (Imaizumi Hitoshi) (70203304)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	伊藤 隆史 (Ito Takashi) (20381171)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三浦 直樹 (Miura Naoki) (80508036)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授 (17701)	
研究分担者	中島 利博 (Nakajima Toshihiro) (90260752)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	削除：2020年3月18日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関