

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07290

研究課題名(和文)敗血症関連DAMPs拮抗因子HRGの血管保護作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the vasoprotective mechanism of sepsis-associated DAMPs antagonist HRG

研究代表者

和氣 秀徳 (Wake, Hidenori)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60570520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症病態の増悪化に關与する2価鉄イオンによる血管内皮細胞障害は、2価鉄イオンによる小胞体ストレス応答よりミトコンドリアが障害され、その結果発生するミトコンドリア由来活性酸素により細胞膜が酸化し、膜が傷害されることで引き起こされることが明らかとなった。また、血漿糖タンパク質 Histidine-rich glycoprotein(HRG)は、上記2価鉄イオンによる血管内皮細胞障害において、小胞体ストレス応答を抑制することにより、細胞保護効果を発揮することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、有効な治療薬の存在しない敗血症病態において、HRGは非常に有望な治療薬候補となる。また、2価鉄イオンによる血管内皮細胞障害機序が明らかにされたことは、今後、重篤な組織・細胞傷害により誘発される細胞死反応をコントロールするための知見が得られたということであり、関連病態の治療薬・治療法開発の一助となる。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that divalent iron ion-induced vascular endothelial cell damage, which is involved in the exacerbation of sepsis, is caused by the cell membrane peroxidation damage by mitochondria-derived reactive oxygen species generated as a result of mitochondrial damage due to endoplasmic reticulum stress response by divalent iron ion stimulation. In addition, plasma glycoprotein Histidine-rich glycoprotein (HRG) was found to exert cytoprotective effects by suppressing the endoplasmic reticulum stress response induced by divalent iron ion in vascular endothelial cell damage.

研究分野：Pharmacology

キーワード：高ヒスチジン糖タンパク質 敗血症 2価鉄イオン 血管内皮細胞 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血漿タンパク Histidine-rich glycoprotein (HRG) は、血液凝固・線溶系の調節作用や血管新生の抑制作用を有することが報告されていた。これらの作用に加え我々は HRG が敗血症病態で特異的に低下する因子であることを見出し、その病態生理学的意義を明らかにした。つまり、HRG には好中球の形態と機能の維持効果、血管内皮細胞の保護効果、赤血球保護効果が存在することを示してきた。HRG は正常血漿中に 60-70 $\mu\text{g/ml}$ 存在し、敗血症病態では 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下に低下する。その結果、上記の HRG 作用が失われ、肺 ARDS の進行、血管内皮細胞障害によるショック、免疫血栓形成亢進による DIC を招来し、同時に細菌貪食能が低下し、敗血症病態のカスケードが進行する。その治療法として、低下している HRG を治療薬として補充する治療法が極めて有効であることを我々はマウスのモデル実験で示し、現在、ヒト血漿 HRG 製剤の開発研究を進めている。HRG の好中球正球化作用や、活性酸素分子種産生抑制作用は、対数用量作用曲線上、きれいなシグモイドカーブを描き、その作用が細胞形質膜に存在する受容体刺激を介する効果であることを強く示唆する。我々は HRG 受容体の同定をすでに開始し、候補分子を 2 種類得ている。また、我々はこれまでに HRG の血管内皮保護作用には様々なタイプの細胞死や細胞を保護するグリコカリックスとの関与を示唆するデータを得てきた。以上の知見より、我々は敗血症性血管内皮障害にはプログラムされた細胞死や血管内皮表面のグリコカリックスが関与し、HRG はそれらのシグナルを HRG レセプターを介して制御しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では敗血症病態において様々な傷害細胞から放出される Damage-associated molecular patterns (DAMPs) (2 価鉄イオン、HMGB1) による血管内皮細胞障害の本態を明らかにすると共に、HRG の血管内皮細胞保護効果の詳細なメカニズムの解明を目的として行う。特に、種々の細胞死形態(アポトーシス、ネクロプトーシス、パイロトーシス、フェロトーシス)と HRG との関連性の解明を中心に調査する。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞刺激

血管内皮細胞株 EA.hy926(EA 細胞)にサンプル(PBS(バッファーコントロール)または、1 μM Human Serum Albumin(タンパクコントロール)または、1 μM HRG)を 1 時間前処理し、その後、細胞刺激薬剤(H_2O (溶媒コントロール)または、0.3 mM 硫酸鉄() (2 価鉄イオン)または、0.3 mM 硫酸鉄() (3 価鉄イオン))で刺激を 0~24 時間行う。

(2) 血管内皮細胞傷害アッセイ

上記刺激後、MTS 細胞生存アッセイ(MTS 試薬と 1 時間反応させ、490 nm における吸光度を測定)もしくは細胞膜不透過性核染色剤である SYTOX Orange で染色し、蛍光顕微鏡により画像を取得後、解析する。

(3) 細胞膜酸化検出

酸化検出蛍光色素である BODIPY581/591 C11 で EA 細胞膜表面を標識し、上記刺激を行う。刺激後、細胞膜が酸化されると蛍光波長が赤から緑にシフトするので、そのシフト量を検出する。

(4) 2 価鉄動態解析

2 価鉄イオンのみ(3 価鉄イオンや他の 2 価金属イオンとも反応しない)と反応する蛍光色素 Ferro Orange で各種刺激後の 2 価鉄イオン動態を蛍光顕微鏡により観察する。

(5) 小胞体ストレス応答解析

上記刺激された EA 細胞よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法により小胞体ストレス関連蛋白(eIF2、PERK、IRE1、ATF6、ATF4、CHOP)およびリン酸化を検出する。

(6) ミトコンドリア障害アッセイ

ミトコンドリア障害を検出するためにミトコンドリア膜電位検出蛍光試薬(JC-1)によりミトコンドリア膜電位の低下を検出する。ミトコンドリア膜電位の低下に伴って JC-1 は赤色から緑色に蛍光波長がシフトする。また、ミトコンドリアスーパーオキシド検出試薬(MitoROS580)によりミトコンドリアで産生される活性酸素(スーパーオキシド)を検出する。

(7) 各種細胞死判別実験

既存の細胞死形態の内、2 価鉄イオンによる血管内皮細胞死がどれに当たるかを調べるため、各細胞死経路で重要な細胞内タンパク質など(pan-Caspase、RIPK1、MLKL、2 価鉄)に対する阻害剤(Z-VAD-FMK、Nec1s、Necrosulfonamide、DFO)を処置し、2 価鉄イオンによる細胞死が阻害されるか調査する。また、カスパーゼ非依存性アポトーシスに関しては、免疫染色によって、AIF の

核外への移行を観察・調査する。

4. 研究成果

(1) 2 価鉄イオンによる血管内皮細胞障害と HRG 作用

溶血や広範囲の組織傷害により細胞から遊離された DAMPs の一種である 2 価鉄イオンは、血管内皮細胞障害を惹起し、敗血症病態増悪化に寄与していると考えられる。そこで、我々は、2 価鉄イオンにより血管内皮細胞障害が引き起こされるか調査をおこなった。また、この反応に HRG がどのように関与するかも調べた。EA 細胞に各種刺激を行い 2 価鉄イオン刺激 6 時間後に MTS アッセイを行い細胞の傷害率を計測したところ、2 価鉄イオン処置群のみ細胞傷害が生じており、その細胞傷害を HRG は完全に抑制することを明らかにした。また、細胞傷害は細胞膜完全性破綻により検出できることから、細胞膜非透過性核染色剤 SYTOX Orange で染色を行うと、MTS アッセイと同様に、2 価鉄イオン処置群のみが細胞膜が破綻し、色素が細胞外から核内に移行し、核が染色され、HRG によりそれは完全に阻害された。

(2) 血管内皮細胞における 2 価鉄イオン動態

2 価鉄イオンは細胞膜を通過し細胞内へと急速に移行し、1 時間程度でプラトーに達した後、徐々に減少した。3 価鉄イオンを処置された群では、おそらく細胞膜上の酵素により 2 価鉄イオンに還元された後、細胞膜を通過し、2 価鉄イオンへの還元の時間もあり、2 価鉄イオン処置群よりも緩やかに細胞内 2 価鉄イオン濃度が上昇し、1 時間でプラトーに達した後、減少した。加えて、2 価鉄イオン、3 価鉄イオン処置群共に最大値は同程度であった。従って、2 価鉄処置群のみ細胞障害が著明に進行するのは、急激な細胞内 2 価鉄イオン流入によるストレスが原因ではないかと考えた。HRG は 2 価鉄イオンと親和性があり、細胞外で HRG は 2 価鉄を中和する可能性が考えられたが、HRG が $1\mu\text{M}$ で 2 価鉄イオンが 0.3mM と非常に大きな濃度差があることや 2 価鉄イオン動態にあまり影響を及ぼさなかったため、HRG の 2 価鉄イオンによる血管内皮細胞障害に対する保護効果の本体は、HRG の 2 価鉄イオン結合中和効果ではないことが示唆された。

(3) 2 価鉄イオン血管内皮細胞障害と小胞体ストレス

2 価鉄イオンの急速な流入による細胞内ストレスが、細胞死を誘導している可能性が考えられたため、小胞体ストレスが関与する可能性を考え、小胞体ストレス関連タンパク (eIF2、PERK、IRE1、ATF6、ATF4、CHOP) の活性に関して調査を行ったところ、2 価鉄イオンは小胞体ストレス応答を誘導しており、HRG はその応答を抑制することが明らかとなった。複数の小胞体ストレス応答関連タンパクの調査を完全には完了していないため、今後、研究を継続する必要があるが、小胞体ストレス応答関連タンパクの内 eIF2 に関しては結果が出たため、以下に記す。小胞体ストレス応答が進行すると eIF2 がリン酸化されるが、2 価鉄イオン処置群のみ 15 分後ぐらいより eIF2 がリン酸化され、HRG はこのリン酸化を抑制したことが分かっている。

(4) 2 価鉄イオン血管内皮細胞障害とミトコンドリア障害

MTS アッセイの原理は細胞死によりミトコンドリア呼吸鎖に存在するコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素の活性が低下することを利用している。従って、2 価鉄イオンはミトコンドリア障害を引き起こすと示唆される。そこで、ミトコンドリア障害の指標としてミトコンドリア膜電位とミトコンドリア スーパーオキシドを計測した。2 価鉄は刺激後 6 時間ぐらいよりミトコンドリア膜電位を低下させ、ミトコンドリア障害を引き起こすと共に、それに伴って起こるミトコンドリア スーパーオキシドの産生を上昇させ、HRG はそれら反応をほぼ完全に抑制した。

(5) 2 価鉄イオン血管内皮細胞障害と細胞膜脂質酸化

SYTOX Orange を用いた細胞膜完全性の研究結果と、ミトコンドリア スーパーオキシド産生の結果より、2 価鉄イオンはミトコンドリアから産生されたスーパーオキシドを起点とした活性酸素により膜脂質が過酸化され、細胞膜の破綻が引き起こされた可能性が推察されたため、膜脂質酸化検出プローブを用いて確認したところ、2 価鉄イオンは刺激後 12 時間ぐらいより細胞膜酸化反応を誘導することが明らかとなった。また、HRG はその反応を完全に抑制した。

(6) 2 価鉄イオン誘発血管内皮細胞障害に対する HRG の保護効果と HRG レセプターの関与

以上の結果より、2 価鉄イオンは細胞内へと急速に流入し、小胞体ストレス反応を誘導後、ミトコンドリア障害を引き起こし、ミトコンドリアより産生された活性酸素により、細胞膜脂質酸化反応を誘導し、細胞膜の破綻により細胞死を引き起こしていることが示唆された。また、ミトコンドリア障害によりエネルギー産生が低下することにより、細胞機能の維持ができなくなり、細胞死が引き起こされていることも示唆された。HRG は 2 価鉄イオンによる細胞死に至る反応の中で 2 価鉄イオン動態にはあまり影響を与えず。その後の小胞体ストレス応答から関与が考えられるため、HRG レセプターからのシグナルによる小胞体ストレス応答阻害が考えられる、しかしながら、HRG レセプターと考えられる CLEC1A、CLEC1B に対する抗体を用いた阻害実験より、HRG の細胞保護効果は阻害されなかったため、これらレセプターの関与は否定された。従って、これら以外の新規 HRG レセプターの存在が考えられ、今後はこれらのレセプター同定を行う必要がある。

(7)2 価鉄イオン血管内皮細胞死形態の特定

2 価鉄イオンによる血管内皮細胞死の形態に関しては、ネクロプトーシス及びパイロトーシス阻害剤では阻害できず、これら細胞死の関与は否定された。パイロトーシスの関与が示唆されている HMGB1 の核から細胞外へのトランスロケーションに関しても 2 価鉄イオンは誘導しなかった。また、アポトーシス関連ではカスパーゼ阻害剤で阻害できなかったため、当初、アポトーシスではないと考えていたが、AIF の核内から細胞外への移行が観察されたことからカスパーゼ非依存性アポトーシスである可能性が示唆された。また、2 価鉄イオンキレーターである DF0 により阻害されることから、フェロトーシスである可能性も非常に高い。従って、当研究における細胞死の形態はフェロトーシスとカスパーゼ非依存性アポトーシスが融合した細胞死であると考えられた。上記(1)～(7)で示した結果は、現在論文として発表する準備を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamazaki Yui, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Liu Keyue, Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Mori Shuji, Yoshino Tadashi, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 408
2. 論文標題 Involvement of multiple scavenger receptors in advanced glycation end product-induced vessel tube formation in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112857 ~ 112857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112857	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 Wake Hidenori, Nishibori Masahiro	4. 巻 155
2. 論文標題 Various functions of plasma histidine-rich glycoprotein and its clinical application as the biomarker and therapeutic drug for sepsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 155 ~ 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.19150	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和氣 秀徳、森 秀治、西堀 正洋、西中 崇、ハティボール オメル ファルク、高橋 英夫
2. 発表標題 敗血症病態改善作用を有する高ヒスチジン糖タンパク質の抗酸化能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和氣 秀徳
2. 発表標題 Anti-DAMPsタンパク質HRGの敗血症治療薬としての可能性とDAMPs関連病態への応用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王登莉, 劉克約, 勅使川原匡, 和氣秀徳, 西堀正洋
2. 発表標題 HMGB1 Translocation in Neurons after Ischemic Insult: Subcellular Localization in Mitochondria and Peroxisomes.
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王登莉, 高尚澤, 劉克約, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 森秀治, 西堀正洋
2. 発表標題 抗HMGB1抗体による硬膜下血腫の治療
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勅使川原匡, 劉克約, 王登莉, 和氣秀徳, 森秀治, 高橋英夫, 西堀正洋
2. 発表標題 マウス周産期における血漿高ヒスチジン糖タンパクの生理的動態解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 活性酸素の産生抑制剤及び/又は消去促進剤	発明者 西堀正洋、森秀治、 和氣秀徳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、210980049910.X	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	勅使川原 匡 (Teshigawara Kiyoshi) (40403737)	岡山大学・医学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	王 登莉 (Wang Dengli) (40815693)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

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