

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790077

研究課題名(和文) 消化管・呼吸器における、ストレスタンパク質による炎症制御

研究課題名(英文) Regulation of inflammation by stress proteins

研究代表者

田中 健一郎 (Tanaka, Kenichiro)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：30555777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：(1)まず細胞膜タンパク質を可溶化し、それと精製したHSP25を結合させ、HSP25と共沈降するタンパク質を同定したところ、機能未知のタンパク質を同定した。一方、HSP25を細胞に作用させ誘導される遺伝子をDNAチップで解析したが、興味深い結果は得られなかった。この機能未知のタンパク質の発現をsiRNAで抑制した細胞では、HSP25依存の炎症がやや減弱していた。(2)HSP70、HSP90、HSP25、HSP47、などを精製し、マウスに投与し、炎症反応が惹起されるかを調べた。その結果、HSP90、HSP25、GRP78、において炎症の惹起が見られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined the role of HSP70 in gastric ulcer healing. Gastric ulcers were produced by focal and serosal application of acetic acid. Expression of HSP70 was induced in both the gastric ulcer margin and granulation tissue. Compared with wild-type mice, gastric ulcer healing was accelerated in transgenic mice expressing HSP70, and both cell proliferation at the gastric ulcer margin and angiogenesis in granulation tissue were enhanced. Oral administration of geranylgeranylacetone, an inducer of HSPs, to wild-type mice, either prior to or after ulcer formation, not only induced expression of HSP70 in the stomach but also accelerated gastric ulcer healing. On the other hand, oral administration of purified recombinant HSP70 prior to the ulcer formation, but not after formation, stimulated gastric ulcer healing. This study provides the first evidence that HSP70 accelerates gastric ulcer healing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：ストレスタンパク質

1. 研究開始当初の背景

自然炎症と炎症性疾患：胃や腸などの消化管は、アルコール、酸、細菌、毒性物質（経口投与される薬物など）など様々なストレスに常に曝されている。また気道や肺胞などの呼吸器も、多量の活性酸素、タバコの煙などのストレスに曝されている。これらのストレスは上皮傷害（上皮細胞死）を誘導し炎症反応を惹起することにより、炎症性疾患（胃潰瘍、小腸潰瘍（現在、治療薬がない）、炎症性腸疾患（難病）などの消化管疾患、COPD（患者数が急増）や特発性肺線維症（治療法がない）などの呼吸器疾患）を引き起こす。私は、様々なストレスに曝されている消化管、呼吸器では、定常的に（健常時でも）ある程度の炎症（自然炎症）が起きておりこの炎症が組織保護に貢献していること、及びこの炎症反応が異常に亢進するとこれら炎症性疾患が発症すると考えている。

2. 研究の目的

本研究の概略：細胞はストレスに曝されるとストレスタンパク質の産生を誘導し（増やし）細胞をストレスに耐性化する。熱ショックタンパク質（HSPs）は代表的なストレスタンパク質であり、HSPs、特に HSP70 は強力に細胞を保護している。私は、ストレスタンパク質が消化管や呼吸器での自然炎症、及び炎症性疾患に重要な役割を果たしていると考え後述するように、これら組織での自然炎症、及び炎症性疾患における HSP70 の役割を明らかにし、またその成果を活かした創薬研究を行った。そこで本研究ではこの研究を継続し、これら組織での自然炎症、及び炎症性疾患における他のストレスタンパク質の役割を解析する。対象とするストレスタンパク質は他の HSPs に加え、我々が胃潰瘍抑制効果を確認している小胞体ストレスタンパク質（GRP78 や ORP150 など）（Tsutsumi, Tanaka et al. *Oncogene* 2006; Namba, Tanaka et al. *Mol Pharmacol* 2007; Namba, Tanaka et al. *Am J Pathol* 2009）及び SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）や HO-1（ヘムオキシゲナーゼ）などの抗酸化タンパク質である。

HSP70 と炎症性疾患：最近我々は、HSP70 が細胞内で NF- κ B（炎症誘導性転写因子）の活性を阻害することにより炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子の産生を抑制することを見出した。従って細胞内の HSP70 は様々な炎症性疾患に対して抑制的に働いていると考えられるが、これまでこのことを支持する直接的な証拠は得られていなかった。そこで私は遺伝子改変マウスと疾患動物モデルを組み合わせた戦略で研究を行った。具体的には、HSP70 を過剰に発現しているマウスは、胃潰瘍・小腸潰瘍・炎症性腸疾患、肺線維症を発症しにくいことを発

見し、HSP70 が抗炎症作用によりこれら疾患を抑制していることを発見した（Aburaya Tanaka et al. *J. Biol. Chem.* 2006; Tanaka et al. *J. Biol. Chem.* 2007; Tanaka et al. *Mol. Pharmacol.* 2007; Suemasu, Tanaka et al. *J. Biol. Chem.* 2009; Asano Tanaka et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* highlighted paper に採択; Tanaka et al. *Biochem. Pharmacol.* 2010）。そこで本研究で我々は、他のストレスタンパク質の炎症性サイトカイン・ケモカイン、細胞接着因子、及び炎症関連転写因子に対する効果を網羅的に検討し、効果が見られた場合はその分子機構を解明する。またこれらのストレスタンパク質の過剰発現マウスと上述の炎症性疾患に関する動物モデルを組み合わせ、ストレスタンパク質による抑制効果を検討する。この研究により、炎症性疾患におけるストレスタンパク質の役割を理解できると考えている。

SOD と炎症性疾患：また私は多くの疾患の原因が活性酸素による組織傷害であることに着目し、活性酸素を消去するストレスタンパク質、SOD に注目した。私は、SOD にリン脂質を結合させその組織親和性と血中安定性を向上させた DDS 製剤・PC-SOD を開発し、この薬が炎症性腸疾患、肺線維症、COPD の動物モデルで予防・治療効果を発揮することを見出した（Ishihara Tanaka et al. *JPET* 2009b; Tanaka et al. *Am J Physiol* 2010; Namba, Tanaka et al. *Cell Death Differ* 2010; Tanaka et al. *JPET* 2011; Namba, Tanaka et al. *PLoS One* in press）。また製薬企業と共同で炎症性腸疾患、及び特発性肺線維症に関する PC-SOD の第二相臨床試験を行いその有効性を確認した。現在、医薬品承認へ向けた大規模国際臨床試験を行っている。

HSP70 と自然炎症：一方私は、定常的な（健常時の）炎症（自然炎症）における HSP70 の役割を明らかにする目的で、健常時の消化管での炎症の程度を、HSP70 過剰発現マウスと野生型マウスで比較した。その結果、HSP70 過剰発現マウスでは野生型マウスに比べ自然炎症が亢進していることを見出した。HSP70 が細胞内で炎症を抑えることと矛盾するこの結果を説明するために我々は様々な解析を行い、産生された HSP70 の一部が能動的に（エキソサイトーシスにより）細胞外へ放出され Toll-like 受容体に結合し、炎症性サイトカインなどを誘導することにより炎症反応を促進していることを見出した。さらに私は、精製した HSP70 を胃内に前投与すると、弱い炎症が惹起される共に、アルコール依存の胃潰瘍発症が抑制されることを見出した（投稿中）。以上の結果は、健常時に産生されている HSP70 の一部は細胞外へ放出され自然炎症を起こしていること、及びこの自然炎症が胃潰瘍を予防していることを示唆している。そこで本研究で私は、細胞外へ放出されたタンパク質による自然

炎症、及びそれによる疾患予防が他のストレスタンパク質でも見られるのかを検討し、見られた場合にはその受容体（ストレスタンパク質を認識し、自然炎症を誘導する受容体（Toll-like 受容体など））を同定する。

HSP70 と治癒：さらに我々は、胃潰瘍治癒における HSP70 の効果を検討した。その結果、HSP70 過剰発現マウスで潰瘍治癒が顕著に促進されていることを見出した。また細胞外の HSP70 は胃潰瘍治癒の初期段階を、細胞内の HSP70 は後期段階を促進していることを見出した（Ishihara Tanaka et al. *Biochem Pharmacol* 2011）。また我々はこの細胞外の HSP70 による治癒促進が Toll-like 受容体を介することを示した。これらの結果から、治癒初期過程においては上皮損傷に伴い放出された HSP70 が炎症反応を促進することにより治癒を促進し、治癒後期過程においては誘導された HSP70 が細胞内で炎症を抑えることにより治癒の終息に貢献していると考えている。そこで本研究で我々は、他のストレスタンパク質でも同様の現象が見られるのかを調べる。

まとめ：以上まとめると、私は、細胞内外の HSP70 が炎症反応と深い関係をもっており、これが自然炎症の誘導、炎症性疾患の予防、炎症性疾患の治癒促進に貢献しているという世界的にも新しい考えを提唱した。本研究はこのアイデアが他のストレスタンパク質にも応用できるかを調べるものである。

ストレスタンパク質誘導薬：一方我々はストレスタンパク質誘導薬に関しても先駆的な研究を行ってきた。ゲラニルゲラニルアセトン（GGA）（商品名：セルベックス）は日本で最もよく使われている胃薬であるが、その作用機構はよく分かっていなかった。我々は徳島大学との共同研究において、GGA が HSP 産生誘導作用を持つことを発見し、GGA は HSP を誘導し胃潰瘍を抑制しているという新しい仮説を提唱しその証明に成功した。さらに GGA が小腸潰瘍、炎症性腸疾患、肺線維症の発症を抑制することを発見した（現在臨床試験が行われている）。以上の結果から、ストレスタンパク質誘導薬は炎症性疾患に有効であることが考えられる。そこで本研究でも炎症性疾患に有効性が示されたストレスタンパク質を誘導する薬を検索し、得られた誘導薬を疾患動物モデルで評価し、治療薬開発に繋げたいと考えている。

まとめ：このように本研究は我々がこれまで独自の観点から世界をリードする形で進めてきたストレスタンパク質研究を土台に、ストレスタンパク質過剰発現など独自の材料を用いて行う研究であり、その獨創性、先駆性は極めて高いと考えている。また医薬品開発に直結する点において、社会的貢献度の高い研究であると考えている。

3. 研究の方法

（1）既存薬ライブラリー、生薬ライブラリーの充実

最近の新薬の臨床試験において、予想外の副作用が発生し開発を中止しなくてはならないケースが増えている。そこで私が注目しているのは、ヒトでの安全性が十分に確認されている既存薬（既に臨床で使われている医薬品）の新しい作用を発見し、その既存薬を別の疾患治療薬として開発する研究である。そこで本研究では我々が所有する既存薬ライブラリーを充実させ、ストレスタンパク質誘導薬のスクリーニングの出発材料とする。長年中国で使用されてきた漢方薬・生薬も同じく、副作用の少ない新薬を発見するために有用な出発材料になる。最近、過去の我々の研究を評価した中国政府から特別に生薬 2000 種が我々に供与された。そこでこの生薬の溶解法や動物・細胞への投与法を確立し、生薬ライブラリーを構築する。

（2）HSP25 に対する受容体の同定

最近我々は、精製した HSP25 をマウスに投与すると炎症（自然炎症）が起こること、及びこの HSP25 に対する受容体が Toll-like 受容体ではないことを示唆している（投稿中）。そこで HSP25 に対する受容体を以下の方法で同定する。

まず細胞膜タンパク質を可溶化し、それと精製した HSP25 を結合させ、HSP25 と共沈降するタンパク質を同定する。一方、HSP25 を細胞に作用させ誘導される遺伝子を DNA チップで解析することにより、HSP25 が活性化する受容体を予測する。次に同定したタンパク質が確かに HSP25 の受容体として働いていることを確認する。まず精製した HSP25 依存性上皮細胞や炎症性細胞で炎症反応（炎症性サイトカインの産生誘導など）を起こす試験管内の系を確立し、同定したタンパク質の発現を siRNA で抑制した細胞では、HSP25 依存の炎症が見られないことを確認する。また同定したタンパク質のノックアウトマウスが入手可能ならそのマウスに、入手不可能な場合は siRNA を投与しそのタンパク質の発現を抑えたマウスに精製した HSP25 を投与し、HSP25 依存の炎症反応が抑制されるかを検討する。

（3）自然炎症を担っているストレスタンパク質の検索とその受容体の同定

上述のように HSP70、及び HSP25 に関して我々は、その過剰発現マウスにおいて健常時の炎症が野生型マウスより高いこと、及び精製したタンパク質の投与により炎症が誘導されることから、これら HSPs が自然炎症を担っていることを示唆した。そこで、他のストレスタンパク質に関しても、その過剰発現マウスで自然炎症が誘導されているかを調べる。具体的には、炎症関連因子を過剰発現マウスと野生型マウスで比較する。注目する因子は、NF-kB や AP-1 などの炎症関連転

写因子、炎症誘導性（及び抑制性）サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子などである。一方、精製したストレスタンパク質を用いた解析も行う。我々は既に、本研究の対象とするストレスタンパク質（HSP70、HSP90、HSP25、HSP47、HSP60、GRP78、ORP150、HO-1、SOD）を大腸菌に発現させるプラスミドを構築しているため、その精製は短期間で可能である。次に精製した各ストレスタンパク質をマウスに投与し、炎症反応が惹起されるかを調べる。また、Toll-like 受容体の阻害剤の同時投与によりこの炎症惹起が抑制されるかを調べ、抑制された場合はそのストレスタンパク質を認識する受容体が Toll-like 受容体と考え、それを確認する実験を行う。一方、Toll-like 受容体の阻害剤で抑制されなかった場合、(2)と同様の方法でその同定を行う。

(4) 各疾患の発症抑制・治癒促進に貢献しているストレスタンパク質の同定

各ストレスタンパク質の過剰発現マウスと各疾患動物モデルを組み合わせ、各種疾患の発症を抑制しているストレスタンパク質を同定する。対象とする疾患（胃潰瘍、小腸潰瘍、炎症性腸疾患、特発性肺線維症、COPD）の動物モデルは既に確立している。過剰発現マウスで疾患抑制が見られた場合、炎症性細胞の浸潤、炎症性サイトカインの量などを測定し、炎症反応も抑制されているかを検討する。炎症が抑制されていた場合、上述の炎症関連因子をストレスタンパク質の過剰発現マウスと野生型マウスで比較する。

さらに各疾患に関して治癒モデルを確立し、その治癒を各ストレスタンパク質が促進するかを調べる。また精製した各ストレスタンパク質を投与し、治癒の促進が見られるかを検討する。促進が見られた場合は、治癒に関与する因子（増殖因子、サイトカインなど）の変化を調べると共に、Toll-like 受容体などの阻害剤でその治癒促進効果が消失するかを調べる。

(5) 各種ストレスタンパク質の作用分子機構の解明

(4)の研究において、ストレスタンパク質が自然炎症を起こしていること、あるいは疾患モデルにおいて発症予防効果や治癒促進効果を発揮していることが示された場合、その分子機構を明らかにする。

具体的には炎症性細胞に各ストレスタンパク質を過剰発現させ、NF- κ B や AP-1 などの炎症関連転写因子の活性、炎症誘導性（及び抑制性）サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子の発現や量を調べる。変化が見られた場合は、シグナルトランスダクションに関与する分子の阻害剤や siRNA 等を用いて、各ストレスタンパク質の作用分子機構を明らかにする。

一方、精製した各ストレスタンパク質を上

皮細胞や炎症性細胞に作用させ、in vivo で見られた現象が再現されるかを検討し、再現された場合にはその分子機構を解明する。

(6) 各ストレスタンパク質誘導薬のスクリーニングとその疾患治療薬としての評価

(1)～(5)の研究で各種疾患に有効であることが示唆されたストレスタンパク質に関して、その誘導薬の検索を行う。スクリーニングは、上述の既存薬ライブラリー、及び生薬ライブラリーから行う。個々のストレスタンパク質遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、それを保持した細胞を用いた系で一次スクリーニングを行い、イムノプロット法で二次スクリーニングを行う。毒性の少ない誘導薬を得たいので、三次スクリーニングではその既存薬・生薬の細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度でストレスタンパク質を誘導するものを選択する。四次スクリーニングではその既存薬・生薬をマウスに投与し、目的のストレスタンパク質を誘導するかを検討する。尚、生薬に関しては、その有効成分を単離・同定し、その分子も下述する評価の対象とする。

次にそれぞれの既存薬や生薬の効果を(4)の研究で用いたシステムを用いて、試験管内で評価する。効果が見られた場合、その効果が目的のストレスタンパク質誘導を介しているかを、siRNA によりそのストレスタンパク質の発現を抑制した場合、その効果が見られなくなるかで判断する。

最終的には、それぞれの誘導薬の治療効果を疾患動物モデルを用いて評価する。効果が見られた場合、その効果が目的のストレスタンパク質誘導を介しているかを、そのストレスタンパク質を誘導出来ないマウスでは、その治療効果が見られなくなるかで判断する。尚、HSP 誘導薬の場合は GGA と比較する。結果を総合的に判断し、それぞれの疾患治療薬として有望なストレスタンパク質誘導薬を決定する。

4. 研究成果

(1) 既存薬ライブラリー、生薬ライブラリーの充実

我々はまず、所有する既存薬ライブラリーを充実させた。また、中国政府から特別に供与された生薬 2000 種の溶解法を確立し、生薬ライブラリーを構築した。

(2) HSP25 に対する受容体の同定

まず細胞膜タンパク質を可溶化し、それと精製した HSP25 を結合させ、HSP25 と共沈降するタンパク質を同定したところ、機能未知のタンパク質を同定した。一方、HSP25 を細胞に作用させ誘導される遺伝子を DNA

チップで解析したが、興味深い結果は得られなかった。この機能未知のタンパク質の発現を siRNA で抑制した細胞では、HSP25 依存の炎症がやや減弱していた。

(3) 自然炎症を担っているストレスタンパク質の検索とその受容体の同定

HSP70、HSP90、HSP25、HSP47、HSP60、GRP78、ORP150、HO-1、SOD を精製し、マウスに投与し、炎症反応が惹起されるかを調べた。その結果、HSP90、HSP25、GRP78、において炎症の惹起が見られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

1. Yamashita, Y., Tanaka, K., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Ishihara, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T., Wada, M., Mashimo, T., Fukunishi, Y. and Mizushima, T. Synthesis and biological comparison of enantiomers of mepenzolate bromide, a muscarinic receptor antagonist with bronchodilatory and anti-inflammatory activities. *Bioorg. & Medic. Chem.* in press.
2. Kurotsu, S., Tanaka, K., Niino, T., Sugizaki, T., Azuma, A., Suzuki, H. and Mizushima, T. Ameliorative effect of mepenzolate bromide against pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.
3. Tanaka, K., Kurotsu, S., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Yamashita, Y., Yamazaki, H., Ishihara, T., Watanabe, H., Maruyama, T., Suzuki, H. and Mizushima, T. Superiority of pulmonary administration of mepenzolate bromide over other routes as treatment for chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* 28, 4510. (2014).
4. Tanaka, K., Ishihara, T., Sugizaki, T., Kobayashi D., Yamashita, Y., Tahara, K., Yamakawa, N., Iijima, K., Mogushi, K., Tanaka, H., Sato, K., Suzuki, H. and Mizushima, T. Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Communications* 4, 2686. (2013)
5. Tanaka, R., Watanabe, H., Kodama, A., Chuang, VTG., Ishima, Y., Hamasaki, K., Tanaka, K., Mizushima, T., Otagiri, M. and Maruyama, T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 345, 271-283. (2013)
DOI:10.1124/jpet.112.201814
6. Yamakawa, N., Suemasu, S., Watanabe, H., Tahara, K., Tanaka, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Maruyama, T. and Mizushima, T. Comparison of pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 28, 118-124. (2013)
7. Tanaka, K., Shirai, A., Ito, Y., Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Expression of 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 818-824. (2012)
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.07.158
8. Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, M., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, S. and Mizushima, T. Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1470-1481. (2012)
DOI:10.1016/j.bcp.2012.09.016
9. Tanaka, K., Azuma, A., Miyazaki, Y., Sato, K. and Mizushima, T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Chest* 142, 1011-1019. (2012)
10. Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, k., Ohtsuka, M. and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *J. Med. Chem.* 55, 5143-5150. (2012)
DOI:10.1021/jm300049g2012
11. Tanaka, K., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1250-L1261. (2012)
DOI:10.1152/ajplung.00019.2012
12. Asano, T., Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tahara, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Fukudo, S. and Mizushima, T. Effects of -(1,3-1,6)-D-glucan on irritable bowel syndrome-related colonic hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 444-449. (2012)
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.03.015

[学会発表](計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中健一郎 (TANAKA, Kenichiro)

慶應義塾大学 薬学部 助教

研究者番号：30555777