

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15120

研究課題名(和文) 新たな細胞保護機構脱ニトロソ化に基づく敗血症心筋障害制御機構の解明と治療薬の探索

研究課題名(英文) Elucidation of septic myocardial injury control mechanism based on denitrosation and search for therapeutic drugs

研究代表者

谷岡 利裕 (TANIOKA, Toshihiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：80360585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：S-ニトロソグルタチオン還元酵素(GSNOR)の役割を解明するために、敗血症モデルの心臓を用いてGSNOR KOマウスにおいて上昇するS-ニトロソ化タンパク質を網羅的に解析した結果、多くのミトコンドリアタンパク質やシャペロンタンパク質群が顕著に上昇していることを明らかにし、そのうちのミトコンドリア局在シャペロンタンパク質Xが実際にS-ニトロソ化されていた。また、GSNORが高発現しているマクロファージの解析では、GSNOR KO由来マクロファージにおいて抗炎症・抗破骨細胞分化作用を認め、そのメカニズムとしてNF- κ Bやc-Fosといった分子の変化が重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), we comprehensively analyzed S-nitrosated protein in GSNOR KO mice using the heart of a sepsis model. As the results, we found numerous mitochondrial proteins and chaperone proteins which were markedly elevated in GSNOR KO mice, and among them mitochondrial localized chaperone protein X was actually S-nitrosated. In the analysis of macrophages in which GSNOR is highly expressed, the anti-inflammatory/anti-osteoclast differentiation effect was observed in GSNOR KO-derived macrophages, and the change in molecules such as NF- κ B and c-Fos was important as a molecular mechanism. Our study identified two diametrically opposed function of GSNOR. GSNOR deficiency acts as anti-inflammatory properties on macrophage, while in heart GSNOR deficiency might be required for inflammation. Our results provide further insight into how a single protein can either function as inflammatory-promotor or inflammatory-suppressor.

研究分野：細胞生化学

キーワード：GSNOR NO 炎症 S-ニトロソ化タンパク質 心臓 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

ヒトの炎症性疾患では炎症時に誘導されてくる誘導型一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (iNOS) により産生される NO により惹起される機能障害や S-ニトロソ化タンパク質の上昇が病態進展に深く関与していると考えられている。過剰に産生された NO は細胞内グルタチオン (GSH) に付加され、GSNO として安定な状態になり、NO 供与体として存在する。一方で、S-ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) は細胞内 GSNO 代謝に関与しており、実際に GSNOR 欠損マウスの細胞内 GSNOR 濃度は高値を示すことが知られている。これまで、GSNOR の様々な機能が報告されており、申請者の共同研究グループでも GSNOR 心臓特異的過剰発現マウスにおいて敗血症による心筋障害を改善することを報告している (Ships PY et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 304, 2013)。このことから、心臓において GSNOR は何らかのタンパク質を脱ニトロソ化することにより心保護作用に働いている可能性を示唆しており、GSNOR 制御タンパク質の網羅的解析を行い、疾患に関わる分子を同定するために、本研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

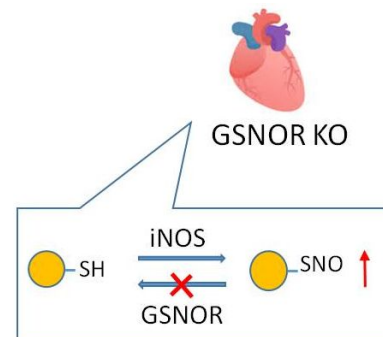
敗血症性心筋障害は発症早期より認められる所見で、炎症性サイトカインの産生が大きな役割を担っている。敗血症早期により放出される TNF- α や IL-1 は主にマクロファージから分泌されるが、しかしながら、心筋細胞からも分泌されることが報告されている。これら炎症性サイトカインは相乗的に心機能を抑制するが、これらのサイトカインは比較的早い段階で収束するため、敗血症で蔓延する心機能障害はこれらのサイトカインだけでは説明がつかない。心機能障害に関与する候補分子として NO や ROS が考えられていることから、本研究では NO を制御することにより敗血症を治療するということを考

え、本研究では S-ニトロソ化タンパク質や GSNO から NO を取り除く酵素である GSNOR に焦点をあて、心臓あるいは炎症系細胞 (特にマクロファージ: 心臓に浸潤しているクロファージを想定) における意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) GSNOR KO マウスで増加する S-ニトロソ化タンパク質の網羅的解析

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス (それぞれ 8 週令、) に LPS を 10 mg/kg の濃度で腹腔内投与し、6 時間後の各種臓器を回収した。また、心臓においてはサンプルを Fluorescence Switch Assay (MEM method) で調整した後、2 次元電気泳動法にて分離した。GSNOR KO 心臓において増加するニトロソ化タンパク質をピックアップし、LC-MS/MS 解析することにより候補分子を同定した。



高感度S-ニトロソ化タンパク質検出法による網羅的解析

(2) GSNOR の炎症における役割解明

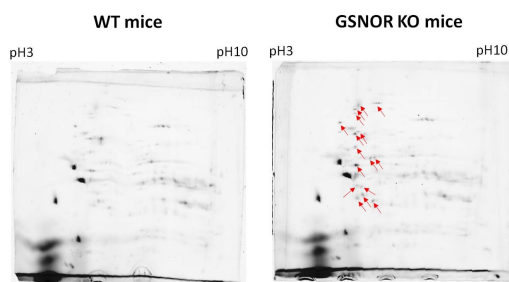
野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス (それぞれ 8 週令、) の骨髄から 10ng/ml M-CSF 処理によりマクロファージを調整し、1 μ g/mL LPS 24 時間刺激することにより炎症を惹起させた。また、得られたマクロファージは一部 100 ng/mL sRANKL で処理することにより破骨細胞へ分化させ、これらの細胞を用いて GSNOR の炎症細胞における役割を解析した。

4. 研究成果

(1) GSNOR KO マウス各種組織を用いた解析

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス (それぞれ 8 週令、) に LPS を 10 mg/kg の濃度で腹腔内投与し、6 時間後の各種臓器 (脳・肺・心臓・肝臓・腎臓・小腸) を回収した後、各種サイトカイン産生を測定した。WT マウスにおける GSNOR 発現全ての臓器で認められたが、肝臓、腎臓、心臓における発現が高かった。LPS 刺激による TNF- および IL-1 産生は WT マウスの各種臓器で上昇したが、GSNOR KO マウスの組織において抑制される傾向にあった。興味深いことに IL-6 産生は WT マウスの LPS 刺激した心臓においてのみ顕著な上昇が認め、GSNOR KO マウスにおいて更なる上昇が認められたことから、心臓における IL-6 産生は GSNOR により負に制御されている可能性が示唆された。

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス (それぞれ 8 週令、) に LPS を 10mg/kg の濃度で腹腔内投与し、6 時間後の心臓を回収した。その後サンプルを Fluorescence Switch Assay (MEM method) でニトロソ化タンパク質のみを検出できるようにしたものを、2 次元電気泳動法にて分離した。その結果、GSNOR KO の LPS 処理した心臓において増加するニトロソ化タンパク質を多数検出することができた。



これらのスポットの LC-MS/MS 解析した結果、ミトコンドリアタンパク質やシャペロンタンパク質など興味深いタンパク質を見出すことができた。このうち、ミトコンドリアタンパク質に局在するシャペロンに関して、実際に GSNOR 心臓においてニトロソ化が上昇さ

れていることを明らかにしている。現在、この候補分子のノックダウン系および過剰発現系の解析が進行中である。

(2) GSNOR KO マウス由来マクロファージを用いた解析

これまで、マクロファージにおいて GSNOR が高発現していることを明らかにしており、心臓におけるサイトカイン産生を担っているマクロファージでの機能について検討した。野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス(それぞれ8週令、)の骨髄から 10ng/ml M-CSF 処理によりマクロファージに分化させたものを用い、1 μg/mL LPS 24 時間刺激することにより炎症を惹起させ、各種炎症性サイトカイン産生を検討した。その結果、WT マウス由来マクロファージにおけるサイトカイン産生は顕著に上昇したのに対し、GSNOR KO マウス由来マクロファージでは炎症性サイトカインおよび mPGES-1 や iNOS などの炎症性分子の発現が顕著に抑制されていることが明らかになった。GSNOR KO マウスによる抗炎症作用のメカニズムを詳細に解析したところ、GSNOR KO マウスによる抗炎症作用は NO 消去剤である CarboxyPT10 処理により回復したことから、GSNOR KO マウスでは細胞内 GSNO 濃度が上昇していることが考えられ、このことが抗炎症作用に起因している可能性を考えている。さらに、通常状態の GSNOR KO マウスの NF- B p65 Ser536 のリン酸化の程度は WT マウスと比較して顕著に抑制していたことから、このことが GSNOR KO マウスの抗炎症に関与している可能性が示唆された。おそらく NF-kB p65 のニトロソ化とリン酸化による制御機構が同時に存在し、これらのバランスにより炎症反応がコントロールされており、NF- B p65 の新たな活性化制御機構として今後詳細に解析を進めることも計画している。

野生型マウスと GSNOR 遺伝子欠損マウス

ス(それぞれ8週令、)の骨髄から10ng/ml M-CSF 処理によりマクロファージに分化させ、さらに100 ng/mL sRANKL で処理することにより破骨細胞へ分化させ、これらの細胞を用いて GSNOR の破骨細胞分化における役割を検討した。WT マウス由来マクロファージ細胞では sRANKL 刺激により破骨細胞分化が誘導されたのに対し、GSNOR KO マウス由来マクロファージでは sRANKL による破骨細胞分化が顕著に抑制された。さらに、破骨細胞分化に重要な役割を担っている c-Fos や NFATc1 などの分子の挙動を検討したところ、GSNOR KO マウス細胞において c-Fos の発現抑制あるいは細胞内局在(核内への移行)が顕著に変動していた。これらのことから、GSNOR KO では破骨細胞分化が抑制されていることが明らかになった。これらのことは、GSNOR 活性低下に基づくニトロソ化タンパク質の上昇に起因したものと考えている。

以上の結果は、GSNOR は心臓において心保護作用に働いている一方で、マクロファージにおける GSNOR は炎症や破骨細胞分化を促進することを示唆しており、これまでの知見における GSNOR タンパク質の組織・細胞により正の制御と負の制御を合わせもつ多様性を反映しているものと考えている。今後はこの知見を考慮した上でより詳細な検討を行う予定である。

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4件)

Nakazawa H, Ikeda K, Shinozaki S, Kobayashi M, Ikegami Y, Fu M, Nakamura T, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JAJ, Tompkins RG, Shimokado K, Yorozu T, Ito H, Inoue S, Kaneki M.: Burn-induced muscle metabolic derangements and mitochondrial dysfunction are

associated with activation of HIF-1 and mTORC1: Role of protein farnesylation. *Sci. Rep.* 7(1): 6618 (2017) 査読有

Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, Yasukawa T, Ishimaru K, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JA, Tompkins RG, Shimokado K, Kaneki M.: iNOS as a Driver of Inflammation and Apoptosis in Mouse Skeletal Muscle after Burn Injury: Possible Involvement of Sirt1 S-Nitrosylation-Mediated Acetylation of p65 NF- κ B and p53. *PLoS One.* 12(1): e0170391. (2017) 査読有

Chiba T, Noji K, Shinozaki S, Suzuki S, Umegaki K, Shimokado K.: Diet-induced non-alcoholic fatty liver disease affects expression of major cytochrome p450 genes in a mouse model. *J. Pharm. Pharmacol.*: 68(12): 1567-1576. (2016) 査読有

Sasaki M, Shinozaki S, Shimokado K.: Sulforaphane promotes murine hair growth by accelerating the degradation of dihydrotestosterone.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472(1): 250-4. (2016) 査読有

[学会発表](計2件)

谷岡 利裕、篠崎 昇平、松田 梨那、成尾宗浩、奥田 貴久、長谷場 健、原 俊太郎: Role of S-nitrosoglutathione Reductase (GSNOR) on inflammation、第13回国際炎症学会、2017年7月8-12日、イギリス・ロンドン

谷岡 利裕、篠崎 昇平、松田 梨那、成尾宗浩、奥田 貴久、長谷場 健、原 俊太郎: Role of S-nitrosoglutathione Reductase (GSNOR) on inflammation、生命科学計学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年12月6-9日、神戸

〔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〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷岡 利裕 (TANIOKA, Toshihiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：80360585

(2) 研究分担者

篠崎 昇平 (SHINOZAKI, Shohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研

究科・寄附講座准教授

研究者番号：40622626