

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15681

研究課題名(和文)敗血症におけるヒストン誘導性細胞死の機構解明

研究課題名(英文)Elucidation for Histone induced cell death in sepsis

研究代表者

中林 修 (NAKABAYASHI, Osamu)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：50328613

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)：敗血症において、ヒストンが大量に血液中に放出されることにより血管内皮細胞が破壊されることが、多臓器不全の一因となっていることが知られている。

ヒストン誘導性細胞死に関する遺伝子の同定を行うため、Gene-trap法を用いてヒストン誘導性細胞死に関する遺伝子の同定を行ったが、耐性クローンは得られなかった。ヒストン細胞死に関わる分子の半減期が長く、十分に細胞内から消失していなかった可能性がある。ヒストンは多くの細胞に細胞死を引き起こすことから、分子標的薬との融合により、抗がん剤としての効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Circulating histones are major mediators of sepsis and cytotoxic to vascular endothelium. For analyzing cytotoxic mechanism of histones, we constructed a haploid genetic screen system using HAP1 cells. Infection efficiency of gene-trap vector to HAP1 cells was 32%, it revealed that high frequency integration was occurred in gene structures. We treated gene-trapped HAP1 cells with histones, surviving cells were treated with histones again. We could not find a mediator gene of histone toxicity, but histones have possibilities medical targets for sepsis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Histone sepsis cell death gene trap

1. 研究開始当初の背景

敗血症により全身で炎症が起こる際、通常は細胞内の核にあるヒストンが大量に血中に放出され、血管内皮細胞を傷害して血管透過性が増加し多臓器不全に至る経路が明らかとなってきた。さらに、マウスおよびサルを用いた敗血症モデルで、リポ多糖や細菌感染による炎症が、ヒストン抗体を投与することにより緩和されることから、血中のヒストンが細胞毒性を持つことは明らかであるが、その細胞障害機構は全く解明されていない。

さらに我々は、検討したすべての細胞株において培地にヒストンを加えるだけで、細胞死が誘導されるが、ヒストン抗体の投与により細胞死が抑えられること、マウスにヒストンを投与すると、肺の炎症によりわずか15分で致死となることを確認した。ヒストン誘導性細胞死は、アポトーシスおよびネクロトーシス阻害剤の影響を受けないこと、細胞死に伴い、他の細胞死には見られない特徴的な顆粒が細胞質に現れることから、未知の細胞死メカニズムと考えている。

2. 研究の目的

「細胞外ヒストン」が細胞死を誘導する機構の解明を目的とし、以下の研究を行った。

1) Gene-trap 法を用いてヒストン誘導性細胞死に関与する遺伝子の同定を行う。2) ヒストン誘導性細胞死の実行遺伝子が、細胞内でどのような機構により細胞死を引き起こすか、解明する。

プログラムされた細胞死は、アポトーシス研究に始まり、ネクロトーシスやピロトーシス、オートファジー等が知られており、それぞれの細胞死において、共通の機構、さらに代償的に働く機構等、明らかとなってきた。本研究は、細胞死研究において、全く新しい細胞死メカニズムを追加することにより、細胞死の理解をより深めることができると考えている。

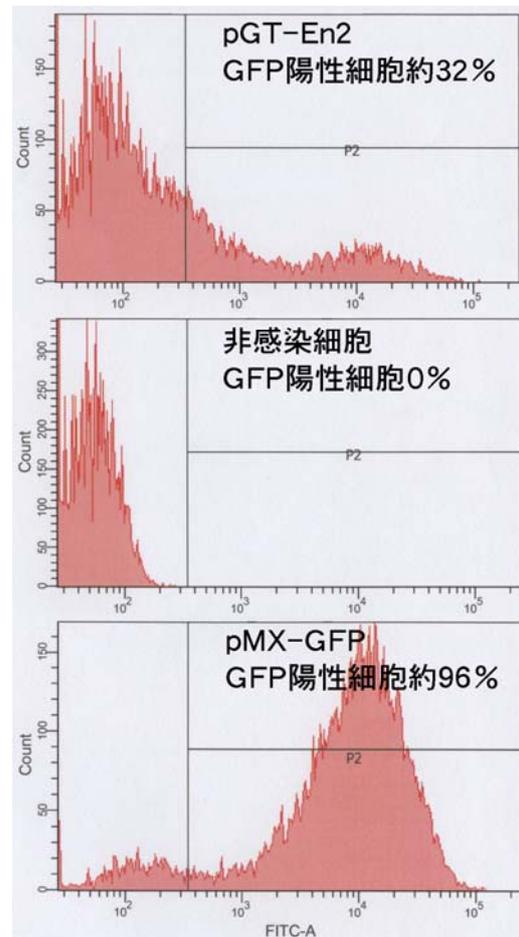
3. 研究の方法

Gene-trap ベクター pGT-En2 を Plat-E 細胞に pCMV-VSV-G と共にリポフェクション法により導入することにより、HAP1 細胞に感染可能な組換えレトロウイルスを生産させた。感染効率を検討するため、pMX-GFP を用いた組換えウイルス粒子の調製も行った。DNA 導入1日後、培地の交換を行い。さらに1日後に Plat-E 細胞培養上清を回収し、ウイルス粒子を PuRetro レンチウイルス&レトロウイルス精製キットを用いて、精製・濃縮した。ウイルス粒子は HAP1 細胞へ感染させ、GFP 陽性となる細胞の割合を測定することにより、濃縮効率の確認を行った。HAP1 細胞への感染は、遠沈管内において細胞とウイルス粒子を混合し、700×g で遠心することにより spin-infection を行った。感染効率の確認は、GFP 陽性細胞を計測することにより行った。

4. 研究成果

HAP1 細胞に組換えウイルスを感染させた後、FACS により感染効率の確認を行った。

Gene-trap ベクターは、染色体にランダムに挿入されるが、ベクター内部に GFP のプロモーター配列が含まれていないため、染色体中の遺伝子内に挿入され、さらに、その遺伝子のプロモーターで転写されたときのみ、GFP 陽性となる(と同時に正常な遺伝子構造は破壊される)。感染細胞の約32%が GFP 陽



性となっており、高頻度でベクターが遺伝子内に挿入され、GFP 陽性となっていることから、高頻度で GFP が遺伝子内に挿入されていることが確認できた。ヒストンによる細胞死誘導を行った後、生存細胞に対し再度ヒストン刺激を行い、ヒストン耐性となっているか確認した。

今回、耐性クローンは得られなかったが、原因として、ヒストン細胞死に関わる蛋白質の半減期が長く、24時間では十分に細胞内から消失せず、ヒストン感受性となっていた可能性がある。今後は、ウイルス感染後に数日培養を続け、FACS により GFP 陽性細胞を濃縮後、ヒストン処理を行いたいと考えている。

敗血症管理は、術中麻酔管理だけでなく術前・術後を通じた周術期管理の重要な要素である。細胞外ヒストンは、NETs (neutrophil extracellular traps) として食食細胞による食食促進に関わることや、血小板血栓の形成

に関わっていることが知られているが、ヒストンの細胞障害メカニズムに関する知見は報告されていない。本研究は、予後不良な敗血症の病態解析や新たな治療標的の提供につながるものと考えられ、社会的貢献は非常に大きいと考えられる。

「細胞外ヒストン」は、多くの培養細胞株において細胞死を引き起こすことから、将来的には分子標的薬とのカップリングにより、抗がん剤としての効果が期待されている。正常細胞への影響を最小限に留め、かつ、がん細胞への効果を最大限に発揮させるためにも、「細胞外ヒストン」による細胞死メカニズムの解明が必要と考えられる。

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9件)

①Xuehua Piao, Ryosuke Miura, Sanae Miyake, Sachiko Komazawa-Sakon, Masato Koike, Ryodai Shindo, Junji Takeda, Akito Hasegawa, Riichiro Abe, Chiharu Nishiyama, Tetsuo Mikami, Hideo Yagita, Yasuo Uchiyama, and Hiroyasu Nakano

Blockade of TNFR1-dependent and -independent cell death is crucial for normal epidermal differentiation

J Allergy Clin Immunol. 査読有

S0091-6749(18)30446-9, 2018

doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.043.

②Nishina, T. Deguchi, Y. Miura, R. Yamazaki, S. Shinkai, Y. Kojima, Y. Okumura, K. Kumagai, Y. Nakano, H.

Critical contribution of NRF2 to an electrophile-induced interleukin-11 production

J Biol Chem. 査読有

292(1):205-216, 2017

doi: 10.1074/jbc.M116.744755.

③Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue J.

HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains.

PLoS Pathog. 査読有

13(1):e1006162, 2017

doi: 10.1371/journal.ppat.1006162.

④Piao X, Yamazaki S, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Nakabayashi O, Kurosawa T, Mikami T, Tanaka M, Van Rooijen N, Ohmuraya M, Oikawa A, Kojima Y, Kakuta S, Uchiyama Y, Tanaka M, Nakano H

Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis and induces an aberrant increase in histone H3 in mouse serum

Hepatology 査読有

65(1):237-252, 2017

doi: 10.1002/hep.28878.

⑤Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H.

The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation

Sci Rep. 査読有

7(1):17402, 2017

doi: 10.1038/s41598-017-17597-3.

⑥山崎 創, 朴 雪花, 中野 裕康

肝炎の制御における骨髄由来細胞の役割

臨床免疫・アレルギー科 査読無

68(5):455-462 2017年

DOI 無

⑦Shindo R, Yamazaki S, Ohmuraya M, Araki K, Nakano H.

Short form FLICE-inhibitory protein

promotes TNFalpha-induced necroptosis in fibroblasts derived from CFLARs transgenic mice

Biochem Biophys Res Commun. 査読有

480(1):23-28, 2016

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.015.

⑧Sakata K, Araki K, Nakano H, Nishina T, Komazawa-Sakon S, Murai S, Lee GE, Hashimoto D, Suzuki C, Uchiyama Y, Notohara K, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Yamamura KI, Baba H, Ohmuraya M.

Novel method to rescue a lethal phenotype through integration of target gene onto the X-chromosome

Sci Rep. 査読有

15:6:37200, 2016

doi:10.1038/srep37200.

⑨Kohda A, Yamazaki S, Sumimoto H.

The Nuclear Protein I κ B ζ Forms a Transcriptionally Active Complex with Nuclear

Factor- κ B (NF- κ B) p50 and the Lcn2

Promoter via the N- and C-terminal Ankyrin Repeat Motifs.

J Biol Chem. 査読有

291(39):20739-52, 2016

doi: 10.1074/jbc.M116.719302.

[学会発表] (計3件)

①中林 修、高橋 宏隆、澤崎 達也、吉田 雪子、佐伯 泰、中野 裕康

MIND BOMB-2はcFLIPLをユビキチン化することで細胞死を抑制する

2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

②中野 裕康

ネクロプトーシスによる生体応答制御

第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会 (招待講演)

2017年

③村井 晋, 山口 良文, 中林 修, 富田
太郎, 赤羽 悟美, 三浦 正幸, 中野裕康
ネクロプトーシスをモニターする FRET プロ
トタイプの開発
第 25 回 日本 Cell Death 学会学術集会
2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中林 修 (NAKABAYASHI, Osamu)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：50328613

(2) 研究分担者

山崎 創 (YAMAZAKI, So)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：70315084

(3) 連携研究者

中野 裕康 (NAKANO, Hiroyasu)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：70276476

(4) 研究協力者

()