

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15770

研究課題名(和文)新規生体危険信号因子ヌクレオフォスミン投与による生体反応の解析

研究課題名(英文)The mechanism of novel alarmin

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオフォスミン(NPM)は細胞の中では核小体に存在している。NPMの働きはリボソームの生合成、中心体複製、細胞周期、アポトーシス、そして細胞の分化に関与している。最近、NPMがエンドトキシン刺激のマクロファージより放出されそしてその放出されたNPMが細胞を刺激し炎症性サイトカインのTNF- α やIL-6を誘導する。この研究において、NPMをマウスに投与するために全長NPMベクターの構築そしてその活性を検討した。その結果、得られたリコンビナント(r)NPMはマウスマクロファージ様細胞RAW264.7を刺激し、TNF- α の産生を誘導した。このように、rNPMをマウスへ投与する準備ができた。

研究成果の概要(英文)：Nucleophosmin (NPM), which is a nucleoprotein, is major multifunctional protein involved in ribosomal biogenesis, centrosome duplication, cell cycle progression, apoptosis, and cell differentiation. Recently, NPM is released from endotoxin-stimulated macrophages and induces inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6, suggesting that NPM might be an alarmin. In this study, to administer NPM to mouse, we established vectors of full-length NPM and found that the recombinant (r) NPM induced TNF-alpha in mouse macrophage-like RAW264.7 cells. In the next step, we are going to administer rNPM to mouse.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 アラーミン ヌクレオフォスミン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

世界において敗血症患者は年間約 800 万人が亡くなっている。これは 3~4 秒に 1 人、世界のどこかで亡くなっている計算になる。今なお敗血症の罹患率は増加傾向にある（世界敗血症デー2015）。したがって、敗血症の予防と治療法の対策は非常に急務である。

われわれは、細胞の核内分子ヌクレオフォスミン (NPM) が新規生体危険信号因子 (アラミン) である可能性を証明した (J. Leukoc. Biol. 86 (2009))。すなわち、1. 敗血症モデルでの腹水中の NPM の検出、2. ヒト血小板の存在、3. 細胞レベルでの NPM の炎症性サイトカイン産生能、4. NPM の阻害剤の確認、5. NPM の受容体結合部位の同定 (平成 26, 27 年度挑戦的萌芽研究) がある。したがって、NPM がアラミンとして機能することを強く示唆する。しかしながら、生体内の投与による NPM の機能は未だに解明されていない。よって、本研究の目的は、マウスに NPM を投与し、致死性およびサイトカイン産生能の可能性を検証することである。そして生体内での NPM の機能解明は、敗血症の新規治療への足がかりになることが期待される。

(1) 生体危険信号因子 (アラミン) とは

アラミンとは、1. 内在性分子、2. 迅速な細胞外への放出、3. 恒常性の機能維持、4. 免疫の活性化 (自然免疫の誘導と獲得免疫の活性化) を有している分子集団である。最も有名な分子に核内タンパクの High Mobility Group Box-1 (HMGB1) がある。HMGB1 は、細胞内では生命の維持に必須な転写などに関与している。最近、HMGB1 が細胞外へ放出され、細胞外での働きは、細胞膜上の受容体、すなわち、Receptor for Advanced Glycation Endoproducs (RAGE)、Toll-like receptor-4 を介して免疫の活性化を誘導している。

したがって、アラミンは、遺伝子レベルでの発現を介さず、瞬時に生体の危険を察知し応答する分子である。

(2) ヌクレオフォスミン

HMGB1 は、興味深いことにヘパリンと結合する。よって、溶液中の HMGB1 の回収にはヘパリン-カラムを用いる (J Clin Invest, 2005, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008)。最近、核小体中の細胞周期に必須な分子、ヌクレオフォスミンがアラミンの可能性が示唆されている。マクロファージ細胞株 (RAW264.7 細胞) に細菌の細胞膜由来の内毒素であるエンドトキシンを添加し、

その後その培養上清中にヘパリン結合タンパクを確認した。その中にヌクレオフォスミンを同定した。さらに、ラットの腹膜炎の腹水中にも NPM を検出した。また、RAW264.7 細胞に NPM を添加すると炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6) の産生を惹起した。しかしながら、アラミンとしての NPM の機能解析は極めて乏しい。したがって、本研究は、「ヌクレオフォスミンはアラミンか？」をねらいとする。

2. 研究の目的

先進国、発展途上国に関わらず敗血症の罹患率は今なお増え続けている。よって敗血症の新規の治療法の確立は急務である。最近、敗血症の病態の進行に伴い、細胞の核から生命維持に必須なタンパク質が放出され本来の生命維持機能とは全く逆の生体を死へ導く分子、すなわち生体危険信号因子 (例 High Mobility Group Box-1) HMGB1、ヒストンなどが報告された。この因子の制御機構の解明は新規敗血症の治療につながる。応募者らは新規の生体危険信号因子 (アラミン)・NPM を発見し、細胞レベルでの機能を解明した。しかしながら、個体レベルにおいて NPM の機能は未だ解明されていない。よって本研究は、アラミンとしての NPM を個体レベルで解決し、臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

NPM はエンドトキシンなどの刺激により細胞外へ放出される。そしてサイトカインとして振舞う。これは既に報告されている HMGB1 の挙動に似ている。HMGB1 の受容体は Toll-like receptor (TLR) -4 より、NPM もその可能性が示唆される。したがって、以下の様な実験を行った。

(1) リコンビナント NPM の単離
マウスの投与において、リコンビナント (r) NPM の単離を行った。

① 大腸菌

BL21 株 (タカラ) を使用した。

② ベクター

pGEX6P-1 (GE) を使用し、遺伝子はヒト NPM を挿入した。NPM は全長 294 アミノ酸。それを全長と N 末側から 3 つに区切りベクターに挿入した。すなわち、1-294 (NPM-full)、N 末側領域から 1-158、(NPM-N) 159-208

(NPM-M)、209-294 (NPM-C) である。

③ タンパク質発現

前培養として、40ml の LB (アンピシリン含) (LB(+)) 培地に形質転換した大腸菌を添加し、37°C で 200rpm で 16 時間培養した。その後、360ml の LB(+) に添加する。1 時間後に 1MIPTG を 400 μ l 加え、3 時間後に大腸菌を回収した。回収後はソニケーション、コスモゲル GST アクセプト (ナカライテスク) を用いて GST タンパク質を結合させた。次に、Turbo3C プロテアーゼにてそれぞれのタンパク質を単離し、濃縮する。

④ 発現の確認

発現の確認には SDS-PAGE とウェスタンブロット法を用いた。NPM の一次抗体にはサンタクルズ社とセルシグナリングテクノロジー社を用いた。

(2) リコンビナントタンパク質の検定

① 細胞

マウスマクロファージ由来細胞 RAW264.7 (ATCC 社(American Culture Collection)) を使用した。培地には 10 ユシ胎児血清 (フナコシ) RPMI1640 (ナカライテスク) として抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (ナカライテスク) を用いた。

② ELISA

マウス tumor necrosis factor (TNF) - α (Biolegend 社) を使用した。

③ 刺激

- a. RAW264.7 細胞を 24well に 2×10^5 コ/well 播種し、一日静置する。
- b. a. の細胞を opti-MEM (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で洗浄し、最終的に 400 μ l の opti-MEM に置き換える。
- c. 2 時間静置後、NPM (最終濃度 1~2nM) を添加する。
- d. NPM 刺激 16 時間後、培養上清を回収する。回収方法は、1.5ml チューブに刺激後の培地 400 μ l を添加する。次に 5000rpm、5 分遠心分離を行い、その上清 350 μ l を新しい 1.5ml チューブで回収する。ELISA 実験を行うまでに -20°C で保存する。

e. d. の上清を ELISA 法により TNF- α を測定する。ELISA 法はキットのプロトコール通りに行った。

④ 有意差検定

有意差検定は、ボンフェローニ法を用いて解析した。有意差の判定は *P* 値が 0.05 未満で行った。

4. 研究成果

(1) rNPM の単離

タンパク質の単離

4 種類のベクターを構築後、発現を行った。その結果、NPM-full、NPM-N、NPM-M、NPM-C の発現を SDS-PAGE、ウェスタンブロット法にて確認した。しかしながら、大量発現を行ったにもかかわらず、期待するほどの量が得られなかった。本来、NPM は核タンパク質であるため、大腸菌の DNA に結合している可能性が示唆される。よって今後は、大腸菌の処理を改良する必要がある。

(2) rNPM の検定

すでにわれわれは、市販のリコンビナント NPM を用い、刺激実験を行ってきた。よって、その方法を用いて行った結果、rNPM-full の最終濃度が 1nM よりコントロールと優位な差を持って TNF- α の産生を誘導した。また他のリコンビナントは TNF- α の誘導は見られなかった。したがって、NPM-full にのみアラーミンとしての可能性が示唆された。

このように、リコンビナントタンパク質を単離し、その活性までを見出した。しかしながら、大量に発現するには効率が悪すぎる。また、タンパク質の単離においての質が安定せず、活性が不安定であった。今後は、大量生産に向けての効率化と質の安定をはかり、マウスへの投与を試みる予定である。

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 12 件)

- ① Kikuchi K, Setoyama K, Kawahara KI, Nagasato T, Terashi T, Ueda K, Nakanishi K, Otsuka S, Miura N, Sameshima H, Hosokawa K, Harada Y, Shrestha B, Yamamoto M, Morimoto-Yamashita Y, Kikuchi H, Kiyama R, Kamikokuryo C, Tancharoen

- S, Sakakima H, Morioka M, Tanaka E, Ito T, Maruyama I.
Oxid Med Cell Longev.
2017;2017:6873281.
doi: 10.1155/2017/6873281.
査読あり
- ② Zahorul Islam M, Kawaguchi H, Miura N, Miyoshi N, Yamazaki-Himeno E, Shiraishi M, Miyamoto A, Tanimoto A. 2017. Hypertension alters the endothelial-dependent biphasic response of bradykinin in isolated Microminipig basilar artery. *Microvasc Res* 114:52-57.
doi:10.1016/j.mvr.2017.06.001
査読あり
- ③ Yamazaki H, Miura N, Lai YC, Takahashi M, Goto-Koshino Y, Yasuyuki M, Nakaichi M, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. 2017. Effects of toceranib phosphate (Palladia) monotherapy on multidrug resistant lymphoma in dogs. *J Vet Med Sci* 79:1225-1229.
doi:10.1292/jvms.16-0457
査読あり
- ④ Yamazaki H, Lai YC, Tateno M, Setoguchi A, Goto-Koshino Y, Endo Y, Nakaichi M, Tsujimoto H, Miura N. 2017. Hypoxia-activated prodrug TH-302 decreased survival rate of canine lymphoma cells under hypoxic condition. *PLoS One* 12:e0177305.
doi:10.1371/journal.pone.0177305
査読あり
- ⑤ Yamada S, Kawaguchi H, Yamada T, Guo X, Matsuo K, Hamada T, Miura N, Tasaki T, Tanimoto A. 2017. Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs. *J Atheroscler Thromb*
doi:10.5551/jat.39909.
査読あり
- ⑥ Lai YC, Fujikawa T, Maemura T, Ando T, Kitahara G, Endo Y, Yamato O, Koiwa M, Kubota C, Miura N. 2017. Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. *PLoS One* 12:e0177182.
doi:10.1371/journal.pone.0177182
査読あり
- ⑦ Lai YC, Fujikawa T, Ando T, Kitahara G, Koiwa M, Kubota C, Miura N. 2017. Rapid Communication: MiR-92a as a housekeeping gene for analysis of bovine mastitis-related microRNA in milk. *J Anim Sci* 95:2732-2735.
doi: 10.2527/jas.2017.1384
査読あり
- ⑧ Morishita S, Kawaguchi H, Ono T, Miura N, Murakoshi M, Sugiyama K, Kato H, Tanimoto A, Nishino H. 2016. Enteric lactoferrin attenuates the development of high-fat and high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Microminipigs. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:295-303.
doi: 10.1080/09168451.2015.1091713

査読あり

- ⑨ Hosokawa K, Ohnishi-Wada T, Sameshima-Kaneko H, Nagasato T, Miura N, Kikuchi K, Koide T, Maruyama I, Urano T. 2016. Plasminogen activator inhibitor type 1 in platelets induces thrombogenicity by increasing thrombolysis resistance under shear stress in an in-vitro flow chamber model. *Thromb Res* 146:69-75. doi:10.1016/j.thromres.2016.09.002
査読あり
- ⑩ 山崎 裕毅, 川畑 貴裕, 澤 真理子, 頼 昱璋, 矢吹 映, 三浦 直樹. 縦隔型 T 細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の 1 例. *日獣会誌*, 69:333-338, 2016.
- ⑪ 藤川 拓郎, 永野 理樹, 和田 三枝, 齋藤 靖生, 乙丸 孝之介, 三浦 直樹, 藤木 誠, 窪田 力. 娩出時肋骨骨折に起因した気管狭窄による呼吸不全子牛の 8 症例. *日獣会誌*, 69:267-270, 2016.
- ⑫ 川口 博明, 笹竹 洋, 野口 倫子, 秋岡 幸兵, 三浦 直樹, 武石 嘉一郎, 堀内 正久, 谷本 昭英. 犬の輸送ストレス軽減のための新規鍼治療の試み. *日獣会誌*, 69:143-146, 2016.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
特任教授
研究者番号：20082282

升田 好樹 (MASUDA Yoshiki)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：10244328

三浦 直樹 (MIURA, Naoki)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・
准教授
研究者番号：80508036

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
講師
研究者番号：20381171