様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号：１２６０２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：１７Ｋ１５４４７

研究課題名（和文）新規DAMPsタンパク質の機能解析

研究課題名（英文）The Screening of novel Damage-associated molecular patterns

研究代表者
松島　隆英（Matsushhima, Takahide）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：４０６３６５６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体は始終生体内外からの侵襲に曝されているが，それらを巧みに処理・対応することで生体の恒常性を維持している。このうち生体内からは内部で生じた壊死細胞由来，あるいは障害を受けた組織由来の分子群であるDAMPsと呼ばれる。特にDAMPsは細胞がネクローシスだけでなくネクロプトーシスなどの多様な細胞死のシグナルを受けて受動的あるいは能動的に分泌する細胞の『ダイイング・メッセージ』とも呼ばれ、主に炎症性の細胞応答を誘導することが明らかとなっている。本研究ではスクリーニングにより同定された新規のDAMPsタンパク質の分泌経路と機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来のDAMPsのスクリーニングでは主に疾患モデルマウスやヒト検体の血清・血漿を用いた質量分析を主体としたプロテオミクス解析が主流であった。しかし本研究に先立って実施したスクリーニングは①細胞障害性の刺激に対して細胞内より分泌し、②免疫系細胞へ結合することで炎症を惹起するというDAMPsタンパク質の２つの特性を考慮した『世界初のDAMPsの機能的スクリーニング』である。このスクリーニングで同定されて因子に関して解析を行った本研究ではこれまでの解析では見落とされてきたDAMPsの同定とその分泌抑制剤の同定に成した。これら成果はDAMPsをターゲットとした治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although the body is exposed to internal and external invasions throughout its life, it maintains its homeostasis by skillfully responding to these invasions. In particular, Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), which are molecules derived from internally generated necrotic cells or from damaged tissues, are also called cellular "dying messages" that cells passively or actively secrete in response to various cell death signals, such as necroptosis as well as necrosis, and have been shown to induce mainly inflammatory cellular responses. In this study, I analyzed the secretory pathway and function of novel DAMPs proteins identified by screening.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：DAMPs　炎症

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

生体は始終生体内外からの侵襲に曝されているが，それらを巧みに処理・対応することで生体の恒常性を維持している。このうち生体外からの侵襲は微生物由来の分子群である Pathogen Associated Molecular Patterns(PAMPs)，生体内からは内部で生じた壊死細胞由来，あるいは障害を受けた組織由来の分子群である Damage Associated Molecular Patterns(DAMPs)と呼ばれる。特に DAMPs は細胞がネクローシスした時だけでなくアポトーシス、ネクロプトーシス、パイロプトーシスと言った多様な細胞死のシグナルを受けて受動的あるいは能動的に分泌する細胞の『ダイイング・メッセージ』とも呼ばれ、主に炎症性の細胞応答を誘導することが明らかとなっている。DAMPs として最も研究が盛んである HMGB1 は本来は核内において遺伝子発現に関与している転写調節タンパク質であるが、LPS などの刺激により小胞体・ゴルジ体を介さない未知の分泌経路で細胞外へ能動的な分泌を受ける（図 1)。これまでの知見では細胞外に分泌された HMGB1 は炎症増悪因子として単独、あるいは同じく刺激依存的に分泌された炎症性サイトカインなどと結合し、各種免疫系細胞を活性化し、炎症応答を惹起することが明らかとなっている。以上のことから HMGB1 を始めとする DAMPs タンパク質は治療ターゲット・病態マーカーとして注目され、これまでに Heat shock protein、S100 protein、IL1a などが同定されてきた。しかしながら細胞が細胞死シグナルを受けた後の DAMPs の分泌経路の活性化機構や実際に炎症増悪を引き起こす詳細な分子機構やその他機能については明らかになっておらず、DAMPs をターゲットとした基盤研究や臨床的応用にはいまだ課題が多数残されている。

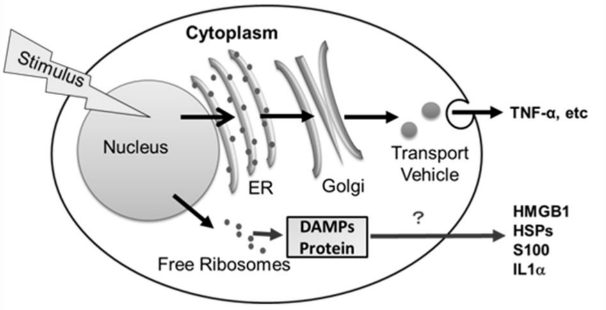

図１.DAMPs タンパク質の分泌

２．研究の目的

DAMPs タンパク質は分泌過程、あるいは炎症惹起の際には未知なタンパク質を含むタンパク質複合体を形成していることが示唆されており、複数の未知の DAMPs タンパク質の存在が示唆されている。そこで本研究では新規の DAMPs タンパク質の同定およびその分泌経路と機能解析を行うことで、細胞死シグナルにおける各種 DAMPs 因子の『ダイイング・メッセージ』としての生理的意義を明らかにするべく研究を進めた。

３．研究の方法

本研究においては未知の DAMPs の機能を明らかにすること、そしてその分泌経路と機能解析を行うことで、細胞死シグナルにおける各種 DAMPs 因子の『ダイイング・メッセージ』としての生理的意義を明らかにするべく研究を進めた。この目的のために本研究では１）新規 DAMPs タンパク質の同定、２）候補因子の分泌と細胞死シグナルと関係性に関する解析、３）候補因子の分泌後の生理的機能解析、４）創薬ターゲットとしての候補因子の評価の４つのステップについて段階的に研究を進めた。すでに本研究に先立って実施したスクリーニングにより 13 コのタンパク質が新規の DAMPs タンパク質候補因子として同定されており、これら因子に着目して生化学的、分子生物学的解析を進めた。

４．研究成果

本研究に先立ち実施したクリーニングにより同定した新規 DAMPs タンパク質候補の 13 因子について内在性タンパク質の分泌解析を行い、Raw264.7 細胞を使用した解析から RNA 結合タンパク質である HNRNPK と SRSF2 の 2 因子についてウエスタンブロット法により Puromysin 刺激によるアポトーシス的刺激下ではなく、LPS や酸化ストレスなどの非アポトーシス的刺激下における内在性タンパク質の細胞外の分泌を確認することができた（**図２**）。またこれらタンパク質の精製タンパク質を調製して Raw264.7 細胞やマウス骨髄由来マクロファージ細胞に添加したところ、それぞれが TNF や IL6 などのサイトカインを誘導し炎症を惹起することが明らかとなった。

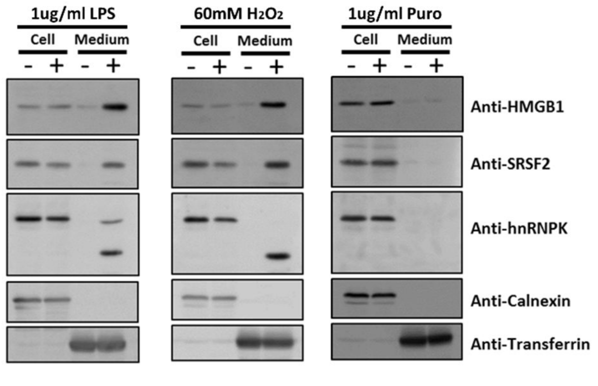

図 2.新規 DAMPs タンパク質の分泌

さらに新規 DAMPs タンパク質の分泌と病態の関係性を明らかにするために敗血症モデルマウス（LPS ショックモデル）、関節炎モデルマウスを作成し、sELISA 法で各タンパク質の血中量を測定した。その結果、HNRNPK が各モデルで血中量が有意に増加していることが明らかとなった。（**図３**，各 N＝5）

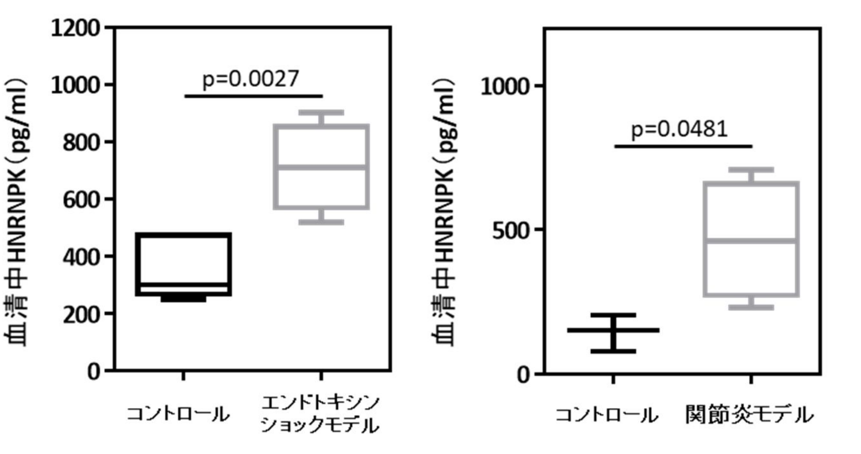

図 3.炎症モデルマウスにおける血中 HNRNPK 量

以上の解析から HNRNPK が新規の DAMPs タンパク質として炎症増悪因子として働く可能性が示唆された。そこで HNRNPK の分泌機構の詳細を明らかにするために、まず分泌タンパク質を簡便かつ安価に測定する方法の開発を行った。分泌タンパク質の測定法として一般的な ELISA は煩雑かつ高価であるため、研究者は分泌タンパク質解析手法としてルシフェラーゼ解析手法を応用することとした。特に Promega 社が開発したスプリット型 Nanoluc である HiBiT タグは 11 アミノ酸の付加により目的タンパク質の発光定量を可能とした「極小」の発光タグであり、ゲノム編集による各遺伝子へのタグ付け（タギング）の際にも一般的に利用されているルシフェラーゼ遺伝子群と比較してゲノムに挿入しやすい特性がある。我々はその特性を利用して Raw264.7 細胞を用いて新規の DAMPs タンパク質候補因子に対して HiBiT タグ・ノックイン細胞の作製をシステマティックに進め、LPS 依存的な新規 DAMP タンパク質候補因子の分泌を 10 分程度で簡便にモニタリングできることを確認した（**図４**, N=5, bar, means ±S.D. , *; p

＜0.05)。そこで新規 DAMP タンパク質候補因子の分泌機構の解明を目的としてこの HiBiT を用いた分泌タンパク質解析と 1200 種の既知の化合物が含まれるケミカルライブラリー(Sigma)を用いて DAMPs タンパク質の分泌を阻害する薬剤のケミカルスクリーニングを実施した（図5)。スクリーニングの結果、HNRNPK の分泌を抑制する化合物として細胞内 Ca イオンを低下させる化合物を複数同定することに成功した。また興味深いことに DAMPs タンパク質の中でも最も研究が盛んな HMGB1 でも同様なスクリーニングを行った結果、同様の化合物が分泌抑制剤として同定された。これら化合物が MT アッセイの結果から細胞生存自体への影響が認められなかったことから、DAMPs タンパク質は細胞内 Ca イオン濃度の上昇を起点として、共通の機構で分泌されている可能性が示唆された。今後はこれら DAMPs タンパク質抑制剤の臨床応用に並行して、この共通の分泌機構に関して詳細な解析を進めていく。

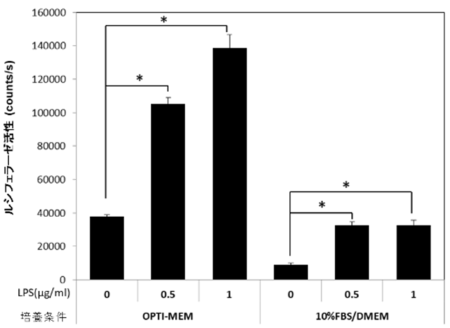

図 4.HiBiT システムによる
培養液中の HNRNPK 量

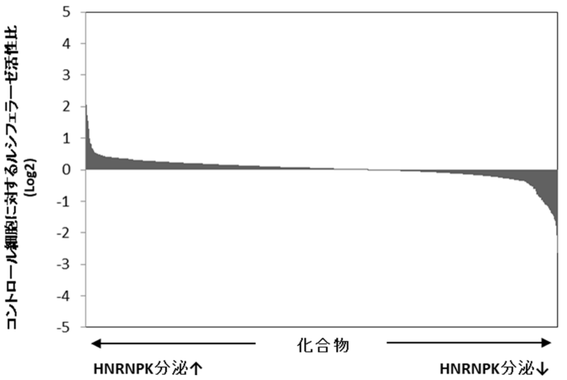

図 5. HNRNPK 分泌制御薬剤の
スクリーニング

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4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 Kataoka K, Matsushima T, Ito Y, Sato T, Yokoyama S, Asahara H	４．巻 36ページ
２．論文標題 Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	６．最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-017-0820-0	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 Uchida Yutaro、Matsushima Takahide、Kurimoto Ryota、Chiba Tomoki、Inutani Yuki、Asahara Hiroshi	４．巻 595
２．論文標題 Identification of chemical compounds regulating PD‐L1 by introducing HiBiT‐tagged cells	５．発行年 2021年
３．雑誌名 FEBS Letters	６．最初と最後の頁 563～576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14032	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 Kurimoto Ryota、Chiba Tomoki、Ito Yoshiaki、Matsushima Takahide、Yano Yuki、Miyata Kohei、Yashiro Yuka、Suzuki Tsutomu、Tomita Kozo、Asahara Hiroshi	４．巻 39
２．論文標題 The tRNA pseudouridine synthase TruB1 regulates the maturation of let‐7 miRNA	５．発行年 2020年
３．雑誌名 The EMBO Journal	６．最初と最後の頁 e104708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104708	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 Yamamoto Hiroto、Uchida Yutaro、Chiba Tomoki、Kurimoto Ryota、Matsushima Takahide、Inotsume Maiko、Ishikawa Chihiro、Li Haiyan、Shiga Takashi、Muratani Masafumi、Uchida Tokujiro、Asahara Hiroshi	４．巻 15
２．論文標題 Transcriptome analysis of sevoflurane exposure effects at the different brain regions	５．発行年 2020年
３．雑誌名 PLOS ONE	６．最初と最後の頁 e0236771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236771	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 －

〔学会発表〕　計20件（うち招待講演　6件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 松島隆英、五島直樹、高橋恒一、落合幸治、板野景子、淺原弘嗣
2．発表標題 Localizatome Project：タンパク質の網羅的細胞内ダイナミクス解析
3．学会等名 第10回 Orthopedic Research Club（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 松島隆英、板野景子、落合幸治、高橋恒一、五島直樹、淺原弘嗣
2．発表標題 Localizatom Project：タンパク質の網羅的細胞内ダイナミクス解析
3．学会等名 第6回ベーシックリサーチカンファレンス
4．発表年 2019年

1．発表者名 内田雄太郎、千葉朋希、松島隆英、栗本遼太、伊藤義晃、淺原弘嗣
2．発表標題 HiBiTシステムを用いたPDL1発現制御因子の探索
3．学会等名 第6回ベーシックリサーチカンファレンス
4．発表年 2019年

1．発表者名 黒岩健、松島隆英、淺原弘嗣
2．発表標題 HMGB1の分泌機構の解析
3．学会等名 第6回ベーシックリサーチカンファレンス
4．発表年 2019年

１．発表者名 寺尾梨沙、松島隆英、五島直樹、高橋恒一、落合幸治、板野景子、淺原弘嗣
２．発表標題 Localizatom Project：タンパク質の網羅的細胞内ダイナミクス解析
３．学会等名 日本筋学会第5回学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 内田雄太郎、山本寛人、伊藤義晃、千葉朋希、松島隆英、栗本遼太、五島直樹
２．発表標題 新規RNA結合タンパク質によるHIF1αの転写後調節
３．学会等名 日本筋学会第5回学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 内田雄太郎、千葉朋希、松島隆英、伊藤義晃、栗本遼太、淺原弘嗣
２．発表標題 HiBiTを用いた新規スクリーニングシステムによるPD-L1の転写後制御機構の解明
３．学会等名 第21回日本RNA学会
４．発表年 2019年

１．発表者名 Hiroshi Asahara, Sho Mokuda, Yoshiaki Ito, Masafumi Inui, Ryo Nakamichi, Tomoki Chiba, Ryota Kurimoto, Takahide Matsushima
２．発表標題 miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy
３．学会等名 The 24th Annual Meeting of the RNA Society（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 松島隆英、淺原弘嗣
２．発表標題 ゲノム編集技術と発光タグシステムを用いた内在性タンパク質解析
３．学会等名 第4回日本ゲノム編集学会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 松島　隆英
２．発表標題 新規ルシフェラーゼ遺伝子技術を応用した分泌タンパク質の解析
３．学会等名 プロメガテクニカルセミナー（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 黒岩　健、松島　隆英、五島　直樹、淺原弘嗣
２．発表標題 新規DAMPsタンパク質の機能解析
３．学会等名 第5回JCRベーシックリサーチカンファレンス
４．発表年 2018年

１．発表者名 松島　隆英
２．発表標題 ゲノム編集技術とHiBiTシステムも用いた内在性タンパク質解析
３．学会等名 Promega Dynamic Connection（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名
松島　隆英、五島　直樹、淺原弘嗣

２．発表標題
ハイスルプットスクリーニング解析顕微鏡システムの開発と応用

３．学会等名
第3回ライフイノベーション公開討論会

４．発表年
2019年

１．発表者名
松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

２．発表標題
新規DAMPsタンパク質のスクリーニングと機能解析

３．学会等名
第3回骨免疫学会

４．発表年
2017年

１．発表者名
松島隆英

２．発表標題
ルシフェラーゼ遺伝子を応用した分泌タンパク質の解析

３．学会等名
Promega NanoLuc セミナー（招待講演）

４．発表年
2017年

１．発表者名
新規DAMPsタンパク質の機能解析

２．発表標題
松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

３．学会等名
第4回JCRベーシックリサーチカンファレンス

４．発表年
2017年

１．発表者名 松島隆英
２．発表標題 分子生物学解析におけるHiBiTテクノロジーの未来
３．学会等名 第40回分子生物学会（招待講演）
４．発表年 2017年

１．発表者名 松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣
２．発表標題 ハイスループットスクリーニング解析顕微鏡システムの開発と応用
３．学会等名 第3回ライフイノベーション公開討論会
４．発表年 2018年

１．発表者名 淺原弘嗣、松島隆英
２．発表標題 タンパク質の網羅的細胞内ダイナミクス解析
３．学会等名 第93回日本生化学会大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 松島隆英、淺原弘嗣
２．発表標題 Localizatom Project：タンパク質の網羅的細胞内ダイナミクス解析
３．学会等名 第43回日本分子生物学会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計1件

1．著者名	4．発行年
Tomoki Chiba、Ryota Kurimoto、Takahide Matsushima、Yoshiaki Ito、Ryo Nakamichi、Martin Lotz、Hiroshi Asahara	2021年
2．出版社	**5．総ページ数**
Springer	16
3．書名	
Chondrocytes Methods and Protocols [MicroRNA Expression Profiling, Target Identification, and Validation in Chondrocytes	

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
炎症疾患における治療マーカー／ターゲットとしてのＨＮＲＮＰＫの臨床 応用	淺原弘嗣、松島隆英、五島直樹	同左
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、特願 2021-003552	2021年	国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

東京医科歯科大学　大学院医歯学総合研究科　システム発生再生医学研究分野
https://www.tmdusystemsbiomedicine.com/

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
研究協力者	淺原　弘嗣 (Asahara Hiroshi)		
研究協力者	五島　直樹 (Goshima Naoki)		

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