

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590316

研究課題名（和文） 炎症・アレルギー病態における抗炎症タンパク質の意義

研究課題名（英文） Dynamic aspect of anti-inflammatory protein on inflammation and allergic diseases.

研究代表者

佐藤 英介 (SATO EISUKE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60211942

研究成果の概要：

本研究では、抗炎症タンパク質であるアネキシン1の細胞内外での作用機構を明らかにした。アネキシン1のN末端のペプチドを2種類合成し、本ペプチドの抗炎症作用を好中球の活性酸素産生抑制能を指標として解析すると、100 μ M以上の高濃度で抑制されたが、低濃度では効果なかった。アネキシン1のトランスジェニックマウスの作製し、炎症病態を軽減することを明らかにした。また、Annexin 1と結合する新規 Kelch-Related ProteinであるKLHL5の他3つの蛋白質を検出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態生化学

キーワード：炎症、アネキシン、活性酸素、抗炎症タンパク質

1. 研究開始当初の背景

炎症は、多くの疾病の病因となり、虚血再還流傷害に限らず糖尿病やがんなど多くの疾病に関わることが報告されている。酸化ストレスは炎症の起点となるだけでなく、増悪因子としても注目され、その量と質を制御することが課題となっている。好中球は、炎症反応のトップバッターとして多量に炎症局所に集積する細胞であり、活性酸素、一酸化窒素 (NO) を艦砲射撃することによって生体を防御している。しかしながら、これらラジカルの生体への過大な侵襲が臓器障害因子となる二面性も持ち合わせている。従って、好中球の活性酸素、一酸化窒素 (NO) の量と質あるいは炎症組織への浸潤を制御することが可能となれば炎症を起因とする疾病を改善することが可能となる。

抗炎症薬としてステロイドが使用されているが副作用が大きくその作用機構の詳細も明らかにされていない。ステロイドの抗炎症作用の本体として抗炎症タンパク質が注目され、本研究者が発見した好中球の細胞質中で刺激物に依存して Ca^{++} 依存性に酸性リン脂質に可逆的に会合するアネキシン 1 も、ステロイドにより発現誘導される蛋白のひとつである。これまで本蛋白が、細胞内でフォスホリパーゼ A_2 を抑制することによって抗炎症作用を示すことを示してきた。近年、本蛋白が炎症部位で細胞外に積極的に分泌され、好中球のフォルミルペプチドの受容体に結合し、好中球の組織への浸潤を抑制することを明らかにしつつある。また、分泌されたアネキシン 1 の限定分解ペプチドも同様の作用をもつ可能性を示しつつある。本研究では、抗炎症タンパク質である好中球のアネキ

シン 1 の細胞内外での作用機構を明らかにし、本タンパク質の限定分解産物である抗炎症ペプチドを検索し、新たな抗炎症ペプチドを開発と炎症を起因とする病態制御を目的とする。

2. 研究の目的

- ① アネキシンは、現在 15 種類検出されているが、酸性リン脂質と結合する C 末端の 4 回の繰り返し構造と N 末端の各アネキシン特異配列からなっており、各アネキシンの性質は N 末端の特異配列が決定する。アネキシン 1 の N 末端は、細胞内で蛋白分解酵素により限定分解される。本研究では、アネキシン 1 の N 末端のペプチドを数種類合成し、どのペプチドが抗炎症作用を示すかを明らかにするとともに、その作用がフォルミルペプチドの受容体を介するのか、新たな受容体を介するのかを解析する。さらに他の細胞と結合性を解析して本ペプチドの作用起点を明らかにする。また、細胞外に放出されたアネキシン 1 あるいは N 末のペプチドの作用を活性酸素産生、細胞接着、細胞骨格などに着目し、その作用を特定する。
- ② 炎症部位では集積した好中球が機能した後、マクロファージに貪食されなければ、ネクローシスにおちいり、組織を傷害する可能性がある。アネキシン 1 は酸性リン脂質であるフォスファチジルセリンに結合するが、好中球より分泌されたアネキシン 1 が、アポトーシスに陥った好中球の細胞外に露出したフォスファチジルセリンに結合し、マクロファ-

ジ側の受容体に結合し、貪食を促進するか否かを解析し、好中球の炎症部位でのクリアランスに關与する可能性を解析する。

- ③ 細胞内での結合タンパク質を解析して、細胞内での働きを明らかにする。
- ④ アネキシン1のトランスジェニックマウスを用いて、種々の炎症を起因とする病態モデルを付加してコントロールマウスと比較し、生体レベルでの実験を行い、その作用を検証する。さらにコンディショナルノックアウトマウスを作成して本タンパク質の生体内での機能を詳細に解析する。

3. 研究の方法

アネキシン1の細胞への作用の解析：細胞レベル

予備実験の結果から現在、明らかになっているアネキシン1の作用は低濃度では好中球の FMLP 受容体刺激による活性酸素産生を抑制するが、高濃度ではN末端ペプチドのうち Ac12-26 それ自身で活性酸素産生を引き起こすことを明らかにしている。さらに。本ペプチドは好中球の細胞浸潤を抑制する傾向をも示した。そこで、アネキシン1のN末端のペプチドの活性を詳細に解析するためN末領域のペプチドを種々の配列および長さのものを数種類合成し、どのペプチドが本作用を示すかを明らかにする。さらに他の細胞への影響を解析して本ペプチドの作用起点を明らかにする。さらに、アネキシン1結合のシグナルが好中球内でどのように伝わるかを解析する。具体的に、細胞内 Ca^{++} の上昇はあるのか、プロテインキナーゼ C、チロシンキナーゼのいずれが活性化するかを解析する。さらに PKC ならばどのサブタイプが活性化されるか、チロシンキナーゼならば受

容体型、非受容体型のいずれが活性化するかをウエスタンブロッティングにより解析する。これらを解析する活性化抗体は揃っており十分解析できる。さらに、細胞接着、細胞骨格系などに着目し、アネキシン1およびペプチドが、好中球側の細胞接着分子 Mac-1 および内皮細胞側の接着分子などの発現に影響するかフローサイトメトリーを用いて、細胞骨格系の重合、脱重合に影響を与えるか否かを形態学的に解析し、その作用を特定する。

アネキシン1の好中球アポトーシスにおける役割の解析

炎症部位では集積した好中球が機能した後、マクロファージに貪食されなければ、ネクローシスにおちいり、組織を傷害する可能性がある。アネキシン1は酸性リン脂質であるフォスファチジルセリンに結合するが、好中球より分泌されたアネキシン1が、アポトーシスに陥った好中球のクリアランスに影響するのかが解析は全く行われていない。この際の作用は幾通りかが考えられる。

- ① アネキシン1が好中球の受容体に結合して直接好中球のアポトーシスを促進あるいは抑制する。
- ② アネキシン1がアポトーシスを起こした好中球の PS に結合して、マクロファージが好中球の PS を認識するのを抑制して貪食を抑制する。
- ③ アネキシン1が好中球の受容体に結合し、マクロファージはアネキシン1のコア領域を PS で認識して貪食を促進する。
- ④ アネキシン1はアポトーシスを起こした好中球にコア領域で PS と結合し、N末の特異配列に対する受容体をマクロファージ側が発現して貪食が促進される。

これらの条件について、完全長のアネキシン 1 のみならず N 末ペプチドおよびコア・アネキシン 1 さらに現在キット化されているアネキシン V と比較することによって、本タンパク質あるいはペプチドが好中球の炎症部位でのクリアランスに関与する可能性を解析する。細胞として好中球、マクロファージを使用することはもちろんのこと細胞系のモデルとして HL-60 細胞を好中球様およびマクロファージ様の 2 つの系に分化させ、それらとアネキシン 1、ペプチド、アネキシン V および特異抗体などを用いて詳細に解析する。

細胞内での結合タンパク質を解析

Annexin 1 結合タンパク質は酵母 Two-Hybrid 法と抗 Annexin1 特異抗体を用いた免疫沈降法により検出した。

アネキシン 1 のトランスジェニックマウス

本マウスを用いて、種々の炎症を起因とする病態モデルを付加してコントロールマウスと比較し、生体レベルでの実験を行い、その作用を検証する。

4. 研究成果

アネキシンは、現在 15 種類検出されているが、酸性リン脂質と結合する C 末端の 4 回の繰り返し構造と N 末端の各アネキシン特異配列からなっており、各アネキシンの性質は N 末端の特異配列が決定する。アネキシン 1 の N 末端は、細胞内で蛋白分解酵素により限定分解されることが判明した。アネキシン 1 の N 末端のペプチドを 2 種類合成し、本ペプチドの抗炎症作用を好中球の活性酸素産生抑制能を指標として解析すると、100 μ M 以上の

高濃度で抑制されたが、低濃度では効果なかった。炎症部位では集積した好中球が機能した後、マクロファージに貪食されなければ、ネクロシスにおちいり、組織を傷害する可能性がある。アネキシン 1 は酸性リン脂質であるフォスファチジルセリンに結合するが、好中球より分泌されたアネキシン 1 が、アポトーシスに陥った好中球の細胞外に露出したフォスファチジルセリンに結合し、マクロファージ側の受容体に結合し、貪食を促進するか否かを解析した結果、好中球に結合するが、炎症部位でのクリアランスには関与しなかった。また、アネキシン 1 のトランスジェニックマウスの作製に成功した。本マウスのフェノタイプは正常であることが判明した。さらに、雌雄ともに繁殖可能なこと、分娩比率も正常であることが判明した。種々の炎症を起因とする病態モデルのうち、エンドトキシンショックを付加してコントロールマウスと比較すると、Tg マウスの生存率が低いことが判明した。Annexin 1 結合タンパク質は酵母 Two-Hybrid 法と抗 Annexin 1 特異抗体を用いた免疫沈降法により検出した。その結果、Annexin 1 と結合する 3 つの蛋白質を検出した。免疫沈降法により、新規 Kelch-Related Protein である KLHL5 と結合することが判明した。KLHL5 は、Annexin 1 および 4 回繰り返し構造である core 領域と結合するが、N 末端の Annexin 1 特異配列とは結合しなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Q Li, E.F. Sato, X Zhu, and M Inoue (2009) A simultaneous release of SOD1 with cytochrome c regulates mitochondria-dependent apoptosis. *Mol Cell Biochem* 322(1-2):151-159 (査読有)

2. Hong, EF Sato, T Nishikawa T Hiramoto K, and M Inoue (2009) Effect of obstructive jaundice and nitric oxide on the profiles of intestinal bacterial flora in wild and iNOS^{-/-} mice *J. Clin Biochem & Nut* , 44(2):160-167 (査読有)
 3. Xiaoping Zhu, EF. Sato, Yi Wang, H Nakamura J Yodoi, M Inoue (2008) Acetyl-L-carnitine suppresses apoptosis of thioredoxin 2-deficient DT40 cells *Arch Biochem and Biophysics*. 478(2): 154-60 (査読有)
 4. Fujita H, Shiosaka M, Ogino T, Okimura Y, Utsumi T, Sato EF, Akagi R, Inoue M, Utsumi K, Sasaki J (2008). Alpha-Lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamin-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of Nrf2/glutathione pathway but not by expression of heme oxygenase-1 *Brain Res* 1206: 1-12 (査読有)
 5. K. Hiramoto, M. Imao, E F Sato, M Inoue and A Mori (2008). Effect of Fermented Papaya Preparation on Dermal and Intestinal Mucosal Immunity and Allergic Inflammations *J. Sci. Food Agri* 88(7):1151-1157 (査読有)
 6. K Hiramoto, T Homma, M Jikumaru, H Miyashita, E F Sato, and M Inoue (2008). Fasting Differentially Modulates the Immunological System: Its Mechanism and Sex Difference *J. Clin Biochem & Nut* 43(2): 75-81 (査読有)
 7. Sato EE, Choudhury T, Nishikawa T, Inoue M. (2008) Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *J Clin Biochem Nutr.* 42:8-13 (査読有)
 8. M Tsuchiya, EF. Sato, M Inoue, and A Asada (2008). Open abdominal surgery increases intra operative oxidative stress: can it be prevented? *Anesthesia & Analgesia* 107(6): 1946-1952 (査読有)
 9. T Choudhury, E F. Sato, M Inoue (2007). Nitrite reductase in Streptococcus mutans plays a critical role in the survival of this pathogen in oral cavity *Oral Microbiology & Immunology* 22: 384-389 (査読有)
 10. M Tsuchiya, EF. Sato, M Inoue, A Asada (2007). Acupuncture enhances generation of nitric oxide and increases local circulation *Anesthesia and Analgesia* 104(2): 301-307 (査読有)
 11. Okai Y, Sato EF, Higashi-Okai K, Inoue M. (2007). Potentiating effect of an endocrine disruptor, para-Nonylphenol, on the generation of reactive oxygen species (ROS) in human venous blood-association with the activation of signal transduction pathway *J UOEH* 29(3): 221-233 (査読有)
 12. M Jikumaru, K Hiramoto, T Honma, E F. Sato, and M Inoue (2007) Effect of starvation on the survival of male and female mice. *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* 39:01-10 (査読有)
- [学会発表] (計 4 件)
1. Zhu X, Sato EF, Kasahara E, Inoue M: Over-expression of annexin 1 inhibits LPS

Induced-inflammatory reactions in mice

第 14 回日本生化学会, 2008 年 12 月 9 日
神戸

2. 佐藤英介, 笠原恵美子、内海耕造、井上
正康:Annexin1 の細胞内結合タンパク質の同
定とその機能解析、第 81 回日本生化学会,
2008 年 12 月 9 日 神戸

3. Sato EF, Zhu X, Kasahara E, Inoue M:
Over-expression of annexin 1 inhibits
LPS-induced inflammatory reactions in mice
第 14 回国際フリーラジカル学会, 2008 年 11
月 18 日 北京

4. 佐藤英介、内海耕造、井上正康:Annexin1
の炎症場様態での機能解析、第 80 回日本生
化学会, 2007 年 12 月 11 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英介 (SATO EISUKE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 60211942

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし