

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390483

研究課題名（和文）プラットフォーム型分子としてのトロンボモジュリンの新規抗炎症効果の探索

研究課題名（英文）Development of a novel anti-inflammation effect in a Thrombomodulin as a platform type molecule

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

研究成果の概要（和文）：トロンボモジュリン（TM）は、凝固線溶系の中心的な分子である。TMは血管内皮細胞だけでなく他の細胞にも発現している。TMは凝固線溶系以外にも機能を有していることが示唆される。実際、TMは新規炎症性メディエーターHigh Mobility Group Box-1（HMGB1）をトロンビンと複合体を形成し、HMGB1の抗炎症作用が見出されている。したがって、本研究ではTMの新規機能および結合タンパク質の探索を目的とする。その結果、TMは核内タンパク質のヒストンH3と結合する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Thrombomodulin (TM) is an endothelial cell surface membrane protein and contains a large extracellular region that harbors a thrombin-binding site. TM is also expressed in other tissues, suggesting that it is thought to perform various functions. Indeed, TM, which is bound to thrombin, plays an important role in the attenuation of the inflammatory response in settings such as High mobility group box-1 protein (HMGB1) degradation. The aims of present study are whether the novel TM-binding protein exists. This study demonstrates that TM might bind to Histone H3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

トロンボモジュリン（TM）は、凝固線溶系の中心的な分子である。具体的には、トロンビンと結合することによりトロンビンの凝固活性を線溶系へとベクトルを180度変換させ凝固カスケードの終息へと導いていく。

最近、TMは、血管外（上皮細胞、ケラチノ

サイト、滑膜細胞等）においても存在が確認され、凝固線溶系の機能とは別な新規機能が期待されている。実際、炎症の場において、TMのN末側のC型レクチン様ドメインが抗炎症活性を示している。しかし、その現象は、細胞内の出来事にすぎず、直接的な証明はなされていない。

申請者らは、TM が‘死のメディエーター’、最近では、炎症の引き金と慢性化に関与している High Mobility Group Box-1 (HMGB1) の直接的な機能抑制を証明し、唯一、生体内で HMGB1 の活性を抑制、HMGB1 タンパクを分解する分子として報告した (Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008;10;1825)。

したがって、TM は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptor (PRP)) の可能性が強く示唆される。ゆえに、TM には、未知の機能と未知のタンパクや非タンパクとの結合が考えられる。

2. 研究の目的

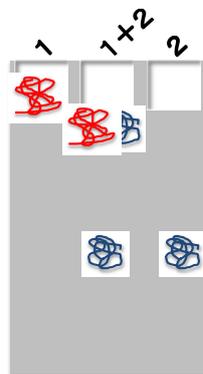
本研究では、細胞内タンパク質、特に核内タンパク質 (ヒストン群) について TM と結合するかに注目した。TM と結合するタンパクを同定しさらなる未知の機能を探索し、新規の TM (プラットフォーム分子として) の機能の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲル内結合アッセイ

ゲル内結合アッセイの原理：試験管内にて 2 種類のタンパク質を混合し、native アクリルアミドゲルを用い電気泳動を行うと結合したタンパク質は本来のタンパク質の移動度とは異なる (図 1)。

リコンビナント TM (1 μ g/mL) 4 μ L とリコンビナントヒストン H3 (1 μ g/mL) 6 μ L を混合し、10 分間室温にて静置する。



1: タンパク質1
2: タンパク質2

図1 nativeアクリルアミドゲル内アッセイの原理

(2) native アクリルアミドゲル電気泳動

リコンビナント TM : ヒストン H3

リコンビナント TM、ヒストン H3-リコンビナント TM 混合液、リコンビナントヒストン H3 の順で 10%-native アクリルアミドゲルに添加し 20mA 定電流にして泳動する。

(3) ウェスタンブロッティング

- ① 泳動後、native アクリルアミドゲルを界面活性剤の SDS を含む Tris-glycine 緩衝液に 10 分室温にて振盪する。
- ② 200mA、50V にてセミドライ法にて転写を行う。
- ③ ポンソー試薬にて転写を確認し、5% スキムミルク、1%牛アルブミンを用いてブロッキングを室温にて 1 時間振盪する。
- ④ 一次抗体に TM を用い、4 $^{\circ}$ C にて一晚振盪する。
- ⑤ washing buffer で洗浄後、一次抗体に対する horseradish peroxidase (HRP) を標識した二次抗体を添加し、室温にて 1 時間振盪する。
- ⑥ washing buffer で洗浄後、HRP の基質 TMB 試薬を添加し、それぞれのタンパク質の検出を行う。

4. 研究成果

本研究において、リコンビナント TM とリコンビナントヒストン H3 が native アクリルアミドゲル内で電気泳動を行った後、ウェスタンブロッティング法 (一次抗体: anti-TM antibody) によって結合することを見出した (図 2)。



図2 トロンボモジュリン(TM)とヒストンH3(H3)の結合
1次抗体: anti-TM

図 2 に示すように、H3+TM のレーンは、TM 単独のレーンと比較して、検出が弱まっていることが確認された (黒矢印)。さらに、TM 単独のレーンでは見られないバンドが確認された (赤矢印)。

したがって、TM とヒストン H3 は結合することが示唆された。

native アクリルアミドゲル内結合法の他に Biacore (ビアコア) を用いたが再現性が得られなかった。よって、さらに他の方法を用いて確認する必要がある。

ヒストンタンパク質は代表的な塩基性タンパク質である。native アクリルアミドゲル電気泳動は、SDS アクリルアミドゲル電気泳動の分子量の違いによる移動度とは違い、タンパク質が本来保持している電荷に依存し

ているところが非常に大きい。したがって、塩基性タンパク質は非常に泳動速度が遅いので、blue-native アクリルアミドゲル電気泳動法を用いることでこの移動度を解消できるかもしれない。

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 23 件)

- ① Yamahata H, Yunoue S, Tokimura H, Hanaya R, Hirano H, Tokudome M, Karki P, Yonezawa H, Sugata S, Kawahara KI, Maruyama I, Arita K. Immunohistochemical expression of thrombomodulin in vestibular schwannoma. Brain Tumor Pathol. 査読有 in press 2012 巻・頁未定 DOI なし
- ② Tada KI, Kawahara KI, Matsushita S, MK615, a *Prunus mume* Steb. Et Zucc ('Ume') Extract, Attenuates the Growth of A375 Melanoma Cells by Inhibiting the ERK1/2-Id-1 Pathway. Phytotherapy Res. 査読有 in press 2012 巻・頁未定 DOI: 10.1002/ptr.
- ③ Yoshifuku A, Oyama K, Ibusuki A, Kawasaki M, Sakanoue M, Matsushita S, Kawai K, Kawahara K, Maruyama I, Kanekura T. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis as an effective treatment for Reiter disease. Clin Exp Dermatol. 査読有 37: 2012. 241-4. DOI: 10.1111/j.
- ④ Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K. Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of high-mobility group box 1. Shock. 査読有 36: 2011. 494-500. DOI なし
- ⑤ Yoshinaga N, Arimura N, Otsuka H, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I, NSAIDs inhibit neovascularization of chroid through HO-1-dependency pathway. Sakamoto T. Lab Invest. 査読有 91: 2011 1277-90. DOI: 10.1038/labinvest.
- ⑥ Kikuchi K, Kawahara K, Miyagi N, Uchikado H, Kuramoto T, Morimoto Y, Tancharoen S, Miura N, Takenouchi K, Oyama Y, Shrestha B, Matsuda F, Yoshida Y, Arimura S, Mera K, Tada K, Yoshinaga N, Maenosono R, Ohno Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Shigemori M, Edaravone: a new therapeutic approach for the treatment of acute stroke. Med Hypotheses. 査読有 75: 2010. 583-5. DOI なし
- ⑦ Saiwichai T, Sangalangarn V, Kawahara K, Oyama Y, Chaichalotornkul S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, Singhasivanon P, Maruyama I, Tancharoen S. Green tea extract supplement inhibition of HMGB1 release in rats exposed to cigarette smoke. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 査読有 41: 2010. 250-8. DOI なし
- ⑧ Shrestha B, Hashiguchi T, Ito T, Miura N, Takenouchi K, Oyama Y, Kawahara K, Tancharoen S, Ki-I Y, Arimura N, Yoshinaga N, Noma S, Shrestha C, Nitanda T, Kitajima S, Arimura K, Sato M, Sakamoto T, Maruyama I. B Cell-Derived Vascular Endothelial Growth Factor A Promotes Lymphangiogenesis and High Endothelial Venule Expansion in Lymph Nodes. J Immunol. 査読有 184: 2010 4819-26. DOI なし
- ⑨ Kozono S, Matsuyama T, Biwasa KK, Kawahara K, Nakajima Y, Yoshimoto T, Yonamine Y, Kadomatsu H, Tancharoen S, Hashiguchi T, Noguchi K, Maruyama I. Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 394: 2010. 928-33. DOI なし
- ⑩ Oyama Y, Hashiguchi T, Taniguchi N, Tancharoen S, Uchimura T, Biswas KK, Kawahara K, Nitanda T, Umekita Y, Lotz M, Maruyama I. High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy. Lab Invest. 査読有 90: 2010. 853-66. DOI なし
- ⑪ Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, Souda M, Yoshida H, Kawahara K, Maruyama I, Komiya S. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. 査読有 Spine (Phila Pa 1976). 35: 2010. 1109-15. DOI なし
- ⑫ Mera K, Kawahara K, Tada K, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. ER signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 397: 2010. 350-4. DOI なし
- ⑬ Ohno Y, Hashiguchi T, Maenosono R,

- Yamashita H, Taira Y, Minowa K, Yamashita Y, Kato Y, Kawahara K, Maruyama I. The diagnostic value of endothelial function as a potential sensor of fatigue in health. *Vasc Health Risk Manag*. 査読有 24; 2010. 135-44. DOI なし
- ⑭ Meng X, Tancharoen S, Kawahara KI, Nawa Y, Taniguchi S, Hashiguchi T, Maruyama I. 1,5-Anhydroglucitol attenuates cytokine release and protects mice with type 2 diabetes from inflammatory reactions. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 査読有 23: 2010. 105-19. DOI なし
- ⑮ Araya N, Arimura H, Kawahara K, Yagishita N, Ishida J, Fujii R, Aratani S, Fujita H, Sato T, Yamano Y, Higuchi I, Osame M, Nishioka K, Fukamizu A, Arimura K, Maruyama I, Nakajima T. Role of Kenae/CCDC125 in cell motility through the deregulation of RhoGTPase. *Int J Mol Med*. 査読有 24: 2009. 605-11. DOI なし
- ⑯ Kikuchi K, Tancharoen S, Matsuda F, Biswas KK, Ito T, Morimoto Y, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Kawahara K. Edaravone attenuates cerebral ischemic injury by suppressing aquaporin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 390: 2009. 1121-5. DOI なし
- ⑰ Kikuchi K, Kawahara K, Tancharoen S, Matsuda F, Morimoto Y, Ito T, Biswas KK, Takenouchi K, Miura N, Oyama Y, Nawa Y, Arimura N, Iwata M, Tajima Y, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, Maruyama I. The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 329: 2009. 865-74. DOI なし
- ⑱ Kawahara K, Hashiguchi T, Masuda K, Saniabadi AR, Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Miura N, Morimoto Y, Biswas KK, Nawa Y, Meng X, Oyama Y, Takenouchi K, Shrestha B, Sameshima H, Shimizu T, Adachi T, Adachi M, Maruyama I. Mechanism of HMGB1 release inhibition from RAW264.7 cells by oleanolic acid in *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Int J Mol Med*. 査読有 23: 2009. 615-20. DOI なし
- ⑲ Kikuchi K, Kawahara K, Biswas KK, Ito T, Tancharoen S, Morimoto Y, Matsuda F, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Yoshida Y, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Hashiguchi T, Maruyama I. 2009. Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 385: 2009. 132-6. DOI なし
- ⑳ Morimoto Y, Kikuchi K, Ito T, Tokuda M, Matsuyama T, Noma S, Hashiguchi T, Torii M, Maruyama I, Kawahara K, MK615 attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine release via MAPK inactivation in murine macrophage-like RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 389: 2009. 90-94. DOI なし
- ㉑ Meng X, Kawahara K, Matsushita K, Nawa Y, Shrestha B, Kikuchi K, Sameshima H, Hashiguchi T, Maruyama I, Attenuation of LPS-induced iNOS expression by 1,5-anhydro-d-fructose. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 387: 2009. 42-46. DOI なし
- ㉒ Kikuchi K, Tancharoen S, Matsuda F, Biswas KK, Ito T, Morimoto Y, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Kawahara K. Edaravone attenuates cerebral ischemic injury by suppressing aquaporin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 390: 2009. 1121-5. DOI なし
- ㉓ Nawa Y, Kawahara K, Tancharoen S, Meng X, Sameshima H, Ito T, Masuda Y, Imaizumi H, Hashiguchi T, Maruyama I. Nucleophosmin may act as an alarmin: implications for severe sepsis. *J Leukoc Biol*. 査読有 86: 2009. 645-53. DOI なし

(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・大学院医歯学総合研究科・
特任教授
研究者番号：20082282

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：70250917

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任講師
研究者番号：20381171

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号：50468055
(H21-H22 研究分担者)