

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03037

研究課題名(和文) DAMPsを制御するペプチドの開発とその応用展開

研究課題名(英文) Development of peptides that regulate DAMPs and their application deployment.

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症の定義の改定により、DAMPsが注目されている。代表的な分子にヒストン4種類、ヌクレオ فسミンがあり、これらの封じ込めは必須である。最近、HMGB1の分子内にHMGB1の炎症作用を抑制する部位が発見され、さらに、NPM1の封じ込めにもNPM1のC末側を見出されている。それらいずれもヘリックス構造をしている。よって、本研究の目的は「DAMPs自身に制御する断片の発見を証明する」である。それを解決するために、上述のDAMPs分子内のヘリックス構造部位を探索し、それら自身が制御できるかを検証した。その結果、ヒストン分子内にDAMPs・ヒストンの機能を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の治療法には、TLR4に対するアンタゴニスト、細胞内シグナル伝達阻害剤が開発された。しかし、効果を示すものの予後に影響を与えなかった。すなわち、DAMPsの機能を制御できなかった。最近、HMGB1のA-box側にDAMPsとしてのHMGB1の炎症作用を抑制することが報告された。すなわち、DAMPs内に抗炎症ペプチドが見出された。よって、DAMPsを直接制御できる新規治療法・ペプチド療法の可能性がヘリックス配列に示唆された。本研究において、ヒストンにもその可能性を見出せたことは、今後の敗血症の新規治療法の確立に意義がある。

研究成果の概要(英文)：With the revision of the definition of sepsis, DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) have attracted attention. Representative molecules include four types of histones and nucleophosmin, and their containment is essential. Recently, a site within the HMGB1 molecule that suppresses HMGB1's inflammatory action has been discovered, and similarly, the C-terminal of NPM1 has been identified for the containment of NPM1. Both structures are α -helices. Therefore, the purpose of this study is to "demonstrate the discovery of fragments within DAMPs that can regulate themselves." To address this, we explored the α -helix structural sites within the DAMPs and verified whether they can self-regulate. As a result, it was suggested that there is a possibility of controlling the function of DAMPs and histones within histone molecules.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症治療 DAMPs ヒストン 抑制ペプチド

1. 研究開始当初の背景

1999年、細胞の核内の分子・High Mobility Group Box (HMGB) 1が敗血症のメディエーターとして報告され、傷害関連分子パターン・Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs (ダンプス))が注目された。さらに2016年、敗血症の定義が「感染症が疑われ、生命を脅かす臓器障害」と改定された。その改定は臓器(細胞)障害から放出されるDAMPsに起因する。有名な分子に細胞内で最も多い分子群の核内タンパク質(ヒストン(H2A、H2B、H3、H4)、HMGB1、ヌクレオフォスミン1(NPM1))があり、受容体はToll-like receptor (TLR) 4と同定された。

敗血症の治療法には、TLR4に対するアンタゴニスト、細胞内シグナル伝達阻害剤が開発された。しかし、効果を示すものの予後に影響を与えなかった。すなわち、DAMPsの機能を制御できなかった。よって新規敗血症の治療法の確立は喫緊の課題である。最近、HMGB1のA-box側にDAMPsとしてのHMGB1の炎症作用を抑制が見出されている(図1)。すなわち、DAMPs内に抗炎症ペプチドが見出された。よって、DAMPsを直接制御できる新規治療法・ペプチド療法の可能性がαヘリックス配列に示唆された。

2. 研究の目的

敗血症の定義の改定からも、DAMPsの制御は必須である。しかし、その制御対象は受容体のみであり、敗血症の予後に影響を与えなかった。NPM1分子内にそれ自身を制御する断片を発見したため((1)、図2)、本研究の目的は、DAMPs自身に制御する断片の発見(主にαヘリックス構造)を証明することである。

そのために、DAMPs分子の立体構造から各断片がDAMPs自身と結合できるかを、培養細胞内でのペプチドの機能検証を行うことが目的である。

3. 研究の方法

- 1) 本研究の目的「DAMPs自身に制御する断片の発見を証明する」において、DAMPs断片の合成は必須である。したがって、ウェブのUniport上にて、はαヘリックス構造部位を探索した。
- 2) 大腸菌発現系を用いたヒストンペプチドの単離(2) BL21株にpGEX6pに挿入したヒストンペプチドの遺伝子配列部位をトランスフェクション後、クローンの発現を確認した。次に、IPTGを用いて、それぞれのGSTタンパク質を発現させ、Turbo3C(ナカライテック社)にて目的のペプチドのみを回収した。回収後は、15%SDS-PAGEにて発現を確認した。
- 3) THP-1細胞の分化 THP-1細胞にホルボールミリステートエステル(PMA)を48時間添加した(3)。その後マクロファージのマーカーのCD68にて、分化を確認した。これ以降、分化させたTHP-1細胞をPMA-THP-1細胞とする。
- 4) ペプチドによるサイトカイン(TNF-α)産生抑制の効果 PMA-THP-1細胞(5×10⁵/well)を24wellプレートに播種し、ヒストンH2A(最終濃度1μM)を添加する。さらに、ヒストンH2A分子内のαヘリックス部位(最終濃度3μM)も同時に添加した。4時間後、培地を回収しELISA(Biolegend社)にてTNF-αを検出した。

A. 新規DAMPsの封じ込めが必要である

- ・TLR-4のアンタゴニスト
- ・TLR-4の細胞内シグナル伝達阻害剤

↓
DAMPs機能を制御できない

↓
DAMPsを直接制御する必要がある

B. DAMPs分子内に抑制断片がある

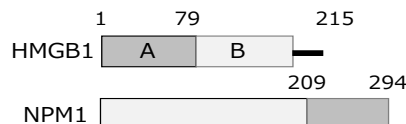


図1. 敗血症の治療標的はDAMPs自身の封じ込めが必要?

A. TLR-4受容体に対する治療の中断にはDAMPsの他の受容体への結合など、他の未知の機能により細胞へ傷害を与えるからである。B. DAMPs・HMGB1、NPM1の分子内には抑制断片が発見される。

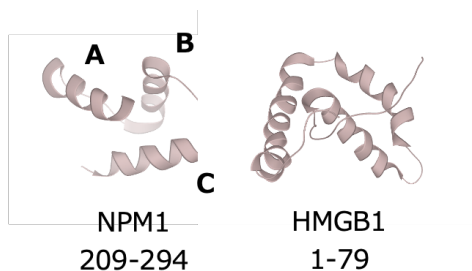


図2. NPM1 (C末側)、HMGB1 (A-box)のαヘリックス領域

A. 244-257 B. 265-257 C. 281-292 (数字はアミノ酸残基数)

- 5) TNF- α の検出
Biolegend 社の ELISA MAX™ Standard Set Human TNF- α を用いて測定した。検出方法はキット内のプロトコールにしたがった。
- 6) 細胞生存アッセイ
PMA-THP-1 細胞 (5×10^5 /well) を 24well プレートに播種し、ヒストン H2A (最終濃度 $1 \mu\text{M}$) を添加する。さらに、ヒストン H2A 分子内の α ヘリックス部位 (最終濃度 $3 \mu\text{M}$) も同時に添加した。4 時間後、WST-8 (ナカライテスク社) を添加し、OD450nm にて細胞生存を調べた。

4. 研究成果

ヒストン H2A は、すでに炎症性サイトカインを産生することが報告されている (4)。本研究では、ヒストン H2A の最適濃度を決定した。その結果、 $1 \mu\text{M}$ が最適であった。

次に、インタクトなヒストン H2A 刺激前に、ヒストン H2A ペプチドと混合し、それを PMA-THP-1 細胞に添加した。同時に、細胞生存アッセイも行った。

その結果、ヒストン H2A ペプチドは、インタクトなヒストン H2A 刺激の TNF- α の産生を明らかに抑制した。なお、この検出方法は、細胞増殖アッセイのデータを元に算出した。このように、ヒストン H2A に関しては、分子内にヒストン H2A を制御する α ヘリックス構造が存在していた。次は、マウスなどを用いて、さらに検証を行う予定である。残念ながら、他のヒストン (ヒストン H2B、H3、H4) に関して、分子内の制御ペプチドを検証した結果、それらの制御が検証できなかった。さらなる他のアプローチを検討する予定である。いずれにしても、 α ヘリックス構造が DAMPs 分子の抗炎症作用を制御できたことは、新規の敗血症治療の可能性を示すことができた。

参考文献

- (1) REMEDY FOR INFLAMMATORY DISEASES W0-2022009894-A1
- (2) TLR4/MD-2 is a receptor for extracellular nucleophosmin 1. Nakatomi K, Ueno H, Ishikawa Y, Salim RC, Mori Y, Kanemoto I, Tancharoen S, Kikuchi K, Miura N, Omori T, Okuda-Ashitaka E, Matsumura K, Imaizumi H, Motomiya Y, Maruyama I, Kawahara KI. Biomed Rep. 2021 Feb;14(2):21. doi: 10.3892/br.2020.1397.
- (3) アスコピロン P:ER ストレス時の CHOP の発現を抑制する 大谷悠人、上野光理、横井春奈、吉永一浩、室屋賢康、丸山征郎、川原幸一 第 96 回日本生化学会大会 講演要旨
- (4) Selective Biological Responses of Phagocytes and Lungs to Purified Histones. Fattahi F, Grailer JJ, Lu H, Dick RS, Parlett M, Zetoune FS, Nuñez G, Ward PA. J Innate Immun. 2017;9(3):300-317. doi: 10.1159/000452951.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kasamo Yuki, Kikuchi Kiyoshi, Yamakuchi Munekazu, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Kambe Yuki, Ito Takashi, Kawahara Ko-ichi, Arita Kazunori, Yoshimoto Koji, Maruyama Ikuro	4. 巻 22
2. 論文標題 1,5-Anhydro-D-fructose Protects against Rotenone-Induced Neuronal Damage In Vitro through Mitochondrial Biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9941 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kamada Hiroki, Emura Kousuke, Yamamoto Rikuto, Kawahara Koichi, Uto Sadahito, Minami Toshiaki, Ito Seiji, Matsumoto Ken-ichi, Okuda-Ashitaka Emiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Hypersensitivity of myelinated A-fibers via toll-like receptor 5 promotes mechanical allodynia in tenascin-X-deficient mice associated with Ehlers-Danlos syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-45638-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman Md. Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Arif Mohammad, Jasineviciute Indre, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 9
2. 論文標題 Upregulation and functional roles of miR-450b in canine oral melanoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Non-coding RNA Research	6. 最初と最後の頁 376 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ncrna.2024.01.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman MD Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Arif Mohammad, Miura Naoki	4. 巻 44
2. 論文標題 Hypoxia-related Y RNA fragments as a novel potential biomarker for distinguishing metastatic oral melanoma from non-metastatic oral melanoma in dogs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Veterinary Quarterly	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01652176.2023.2300943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman Md. Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Arif Mohammad, Iwanaga Tomoko, Tsukiyama Kohara Kyoko, Jasineviciute Indre, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of miR 301a and its functional roles in canine oral melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 78 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12954	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 該当する

1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman Md Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Nozaki Nobuhiro, Yamato Osamu, Miura Naoki	4. 巻 691
2. 論文標題 YRNA and tRNA fragments can differentiate benign from malignant canine mammary gland tumors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149336 ~ 149336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149336	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 該当する

1. 著者名 Jasineviciute Indre, Hasan Md Nazmul, Grigas Juozas, Pautienius Arnoldas, Stankevicius Arunas, Zymantiene Judita, Miura Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 microRNAs Are Abundant and Stable in Platelet-Rich Fibrin and Other Autologous Blood Products of Canines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 770 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大谷悠人、上野光理、横井春奈、吉永一浩、室屋賢康、丸山征郎、川原幸一
2. 発表標題 アスコピロンP:ERストレス時のCHOPの発現を抑制する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	升田 好樹 (Masuda Yoshiki) (10244328)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	伊藤 隆史 (Ito Takashi) (20381171)	熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授 (17401)	
研究分担者	寺崎 寛人 (Terasaki Hiroto) (20746888)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	三浦 直樹 (Miura Naoki) (80508036)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授 (17701)	
研究分担者	菊池 清志 (Kikuchi Kiyoshi) (60404539)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	中原 真由美 (Nakahara Mayumi) (90707514)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師 (17701)	

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
---------	---------