

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06701

研究課題名(和文)炎症抑制性DAMPsの新規同定と炎症性疾患における病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Identification of inflammation suppressive DAMPs and their pathophysiological significance in inflammatory diseases

研究代表者

渡邊 政博 (WATANABE, Masahiro)

就実大学・薬学部・准教授

研究者番号：10758246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な要因によって本来の体内の存在部位とは異なる場所に移動した生体分子(ダメージ関連分子パターン：DAMPs)が、炎症を引き起こすことが明らかになった。DAMPsは、生体内において持続する炎症(慢性炎症)の要因となり、生活習慣に起因するとされる糖尿病等の疾患や、加齢に伴う生理機能の変化、癌等の引き起こす可能性が示唆されている。本研究において我々は、生体内にDAMPsと類似したメカニズムによって出現し、DAMPsの作用を抑制する分子(炎症抑制性DAMPs)が存在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DAMPsが種々の慢性炎症が原因となる疾患の要因となる可能性は既に指摘され、DAMPsを標的とした新規疾患治療法が模索されている。本研究では、生体内にDAMPsと対になって炎症を制御するメカニズム(抑制性DAMPs)が存在する可能性を示した。抑制性DAMPsの発見は、DAMPsによる炎症反応を制御するメカニズムに新たな知見を追加することのみならず、DAMPsを標的とした治療法を考える上で、新たな標的となる可能性を有しており、今後の新規治療法の開発や創薬に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that biomolecules (damage-associated molecular patterns: DAMPs) that have migrated to different locations from their original sites in the body due to various factors induce inflammation. DAMPs may cause diseases such as diabetes, age-related changes in physiological functions, and cancer, which are believed to be caused by lifestyle-related factors. In this study, we demonstrated the existence of molecules that appear by a mechanism similar to that of DAMPs and inhibit the action of DAMPs (suppressive DAMPs).

研究分野：医療薬学

キーワード：ダメージ関連分子パターン DAMPs HMGB1 LPS リボソームタンパク質 終末糖化産物 AGEs

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム関連疾患の要因と考えられている非感染性の持続炎症(慢性炎症)や感染症に伴う炎症の増悪化などの既知の炎症制御メカニズムでは完全な説明が困難な病態の要因として、新たに見出された内在性起炎分子である終末糖化産物(advanced glycation end products: AGEs)とダメージ関連分子パターン(damage associated molecular patterns: DAMPs)が注目されている。

AGEsは、生体分子に複合的に糖質が結合して生じる分子群である。近年、生体内において生成したAGEsが内在性の起炎分子として作用することが報告された。またDAMPsは、組織損傷や過剰な免疫炎症反応をきっかけとして、細胞内から細胞外へと移動し、炎症反応を誘導する分子の総称である。AGEsとDAMPsの作用メカニズムは完全に明らかになっていないものの、receptor for AGEs: RAGE)やToll様受容体(TLR)などの共通した受容体を介して炎症反応をひき起こすことが示唆されている[1]。このことから我々は、AGEsとDAMPsが協調的に作用する可能性に注目してきた。

我々は、AGEsの作用メカニズムの解析を進める中で、AGEsがいくつかのサイトカインと直接的に相互作用し、その分子の機能を変化させる作用をもつことを明らかにした[2]。そこで、プロテインアレイを用いてAGEsと結合するサイトカイン類の探索を試みたところ、AGEsが代表的なDAMPsであるhigh mobility group box 1(HMGB1)と相互作用することを見出した。この相互作用は、HMGB1とリポ多糖(LPS)が共存した際に生じる炎症反応を増強することが明らかとなった[3]。この知見は、AGEsと相互作用する分子のなかに、未知のDAMPsや、既知のDAMPsの機能を変化させる分子が含まれる可能性を示唆している。そこで我々は、AGEs化した担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、リボソームタンパク質の一部がAGEsと結合することを見出した。これらのタンパク質は、HMGB1と同様に死細胞から放出されることが確認された。一方で、これらのタンパク質の共存は、HMGB1とLPSにより生じる炎症反応を抑制することが示唆された。これらの知見から、一部のリボソームタンパク質は、既知のDAMPsと同じ挙動を示しながら、DAMPsによる炎症の抑制に寄与する炎症抑制性(抗炎症性)DAMPsである可能性が考えられた。

内在性の代表的な炎症関連分子である炎症性サイトカインには、逆の作用を有する分子として抗炎症性サイトカインが存在しており、両者のバランスによって炎症が制御されると考えられている。一方で、炎症性サイトカインと同様に炎症を促進する分子であるDAMPsについては、抗炎症性サイトカインに相当する分子の存在は検討されてこなかった。一部のリボソームタンパク質が、DAMPsにおける抗炎症性サイトカインの役割を担う分子であるとすれば、DAMPsに起因する疾患の形成メカニズムや、それらに対する治療法の開発を試みる上で大きな進展となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究において我々は、AGEs結合分子として見出したリボソームタンパク質が、炎症性サイトカインに対する抗炎症性サイトカインに相当する抗炎症性DAMPsとして機能する分子であることを実証し、炎症性疾患における既知のDAMPsやAGEsとの関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 炎症性疾患モデルにおけるRPL9の挙動の検討

これまでの検討により、AGEsと結合するリボソームタンパク質であるribosomal protein L9(RPL9)が、HMGB1と同様にDAMPsに特徴的な挙動を示すことが示唆されていた。この挙動を細胞モデルと炎症性疾患動物モデルを用いて検証した。

(2) 抗炎症性DAMPsとしてのRPL9の作用の検討

マクロファージモデルとして用いられるRAW264.7細胞を用いて、RPL9がLPS・HMGB1との共存下において抗炎症性DAMPsとして作用することを検証した。さらに、RPL9の作用メカニズムに関わる知見を得ることを目的として、これらの分子間の相互作用を検討した。

(3) 抗炎症性DAMPsとしてのRPL9の作用メカニズムの検討

抗炎症性DAMPsとしてのRPL9の作用メカニズムをより詳細に検討することを目的として、RPL9以外のリボソームタンパク質が抗炎症性DAMPsとしての機能を有するか否かについて検討した。さらに、RPL9はAGEs結合分子として見出された分子であることから、AGEsとの相互作用が抗炎症性DAMPsとしての作用に与える影響について検討した。

(4) 生体内AGEsの蓄積に影響する分子の探索

(1)~(3)の検討を進める中で、炎症性疾患におけるDAMPsや抗炎症性DAMPsの役割を理解

するためには、DAMPs としての HMGB1 の作用を促進し、HMGB1 や RPL9 と相互作用することを見出している AGEs の生成や蓄積について検討する必要があると考えた。これまでに、AGEs の基質となる糖代謝産物を代謝する酵素として、glyoxalase 1 (GL01) が同定されており、この酵素の活性に影響を与える分子は、生体内で AGEs の生成や蓄積に影響を与えたと考えられた。そこで、(1)~(3)の検討を進める中で確立したリコンビナント分子の調製手法を応用してリコンビナント GL01 を調製し、この分子を用いて GL01 活性測定系を構築し、GL01 活性に影響を与える分子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 炎症性疾患モデルにおける RPL9 の挙動の検討

HMGB1 をはじめとする DAMPs が細胞内から細胞外へと移行するメカニズムについて、さまざまな報告がなされている。それらの中で、最も基本的なメカニズムと考えられるのが、細胞死に伴う受動拡散である。そこで、培養細胞を凍結-融解するサイクルを複数回繰り返すことにより、細胞を破壊した際に、可溶性画分に移行するタンパク質を抽出し、HMGB1 と RPL9 の挙動を比較した。その結果、RPL9 は HMGB1 と同様に可溶性画分から検出されることが示された。一方で、可溶性タンパク質であれば、共通してこのような挙動を示すとも考えられる。そこで続いて、LPS を投与することにより作製した敗血症モデルマウスの血液中に RPL9 が現れるか否かを検討した。血液サンプルを用いた ELISA により、HMGB1 は、作製したモデルマウス血液中で大きく増加することが示された。同一のサンプルを用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、RPL9 も HMGB1 と同様にモデルマウスの血液中に現れることが示された [4]。

これらの結果より、RPL9 は細胞モデルおよび動物モデルの双方において HMGB1 と同様の挙動を示すことが明らかとなった。HMGB1 が細胞から放出されるメカニズムとしては、受動拡散以外に能動的に放出される機構も存在するとされている。RPL9 が HMGB1 のように能動的に放出されるか否かについては、今後検討を行っていく必要がある。

(2) 抗炎症性 DAMPs としての RPL9 の作用の検討

マクロファージモデルとして用いられる RAW264.7 細胞に、LPS・HMGB1・RPL9 を与えた際の炎症反応の変化を、TNF- α の mRNA 量および培養上清への TNF- α 放出量を指標として解析した。その結果、LPS と HMGB1 の共存は LPS 単独の場合と比較して有意に TNF- α の発現と放出を促進することが示された。同一の実験条件の下、LPS・HMGB1 に加えて RPL9 を共存させたところ、TNF- α の発現と放出は有意に抑制された。なお、LPS と RPL9 のみを共存させた場合は、LPS 単独の場合と同等の反応しか示さなかった。また、この現象は、RPL9 の代わりに BSA を用いた場合には観察されなかった [4]。

これらの結果より、RPL9 は LPS と HMGB1 によって誘導される炎症反応を抑制する作用を有することが示唆された。

続いて、RPL9 の炎症抑制作用のメカニズムについて手がかりを得るために、differential scanning fluorimetry を用いて、関連分子間の相互作用を検討した。その結果、HMGB1 と LPS は相互作用するのに対して、RPL9 と LPS は相互作用しないことが示唆された。さらに、同様の解析により、HMGB1 と RPL9 が複合体を形成する可能性が示唆された [4]。

これらの結果より、RPL9 は HMGB1 と結合することにより、LPS と HMGB1 によって生じる炎症反応の促進を阻害する可能性が考えられた。

(3) 抗炎症性 DAMPs としての RPL9 の作用メカニズムの検討

(2) で得られた知見をふまえて、RPL9 の作用メカニズムをより明確にするために、RPL9 以外のリボソームタンパク質の作用を検討した。いくつかのリボソームタンパク質の発現系を構築し、リコンビナント分子が十分に得られた RPS5 と RPS12 を比較対象として用いた。まず、(2) と同様に、LPS と HMGB1 によって生じる炎症反応の促進に対するこれらのリボソームタンパク質の作用について検討した。その結果、RPS5 は RPL9 と同様に、LPS+HMGB1 の作用を抑制するものの、RPS12 は抑制しないことが示された [5]。

これらの結果は、RPL9 の有する LPS+HMGB1 の作用を阻害する作用は、リボソームタンパク質に共通する特徴ではないことを示唆している。

RPL9・RPS5 と RPS12 のアミノ酸配列を比較したところ、前者は塩基性アミノ酸を多く含むことが明らかになった。このアミノ酸組成の違いが、LPS+HMGB1 の作用阻害に寄与している可能性を検討するために、塩基性アミノ酸であるリジンを連結した poly-K および酸性アミノ酸であるグルタミン酸を連結した poly-E を用いて検討を行った。その結果、RPL9 の代わりに、poly-K を共存させたところ RPL9 と同様に LPS+HMGB1 の作用を阻害することが示された。一方で、poly-E は RPL9 と同様の作用は示さなかった。さらに、連結していないリジンのみを poly-K の代わりに用いたところ、RPL9 と同様の作用は示さなかった [5]。

これらの結果は、RPL9 や RPS5 が塩基性に富むということではなく、これらの分子のアミノ酸配列のうち、一定の領域が LPS+HMGB1 の作用の阻害に関与していることを示唆していると考えられた。

類似した事例を参考として [6]、RPL9 のアミノ酸配列のうち、阻害作用に関与している可能性の高い領域を決定し、相当するアミノ酸配列から成るペプチドを作製した。このペプチドを

LPS・HMGB1を共存させたところ、RPL9やpoly-Kと同様に、LPS+HMGB1の作用を阻害した。さらに、RPL9のアミノ酸配列のうち、任意に選択した塩基性アミノ酸を含まない領域から作製したペプチドは、阻害作用を有さないことが確認された [5]。

これらの結果より、RPL9のアミノ酸配列のうち、LPS+HMGB1の作用阻害に關与する領域が特定された。

RPL9はAGEsと相互作用する分子として見出した分子であるため、RPL9の作用にLPSやHMGB1との相互作用が關与するとすれば、AGEsの共存の影響を受ける可能性が考えられる。はじめに、プルダウン法により、RPL9・RPS5・RPS12とAGEsの相互作用の有無について検討したところ、いずれの分子もAGEsと結合する可能性が示唆された。そこで、LPS・HMGB1およびRPL9・RPS5・RPS12に加えてAGEsを共存させた際の炎症反応の変化を検討した。その結果、AGEsの共存によりRPL9とRPS5によるLPS+HMGB1の作用阻害は抑制されることが示唆された [5]。

これらの結果より、AGEsはRPL9やRPS5と直接相互作用することにより、これらの分子によるLPS+HMGB1の作用阻害を阻害する可能性が示唆された。

(4) 生体内AGEsの蓄積に影響する分子の探索

(3)までの検討から、RPL9やRPS5等の一部のリボソームタンパク質は、LPSとHMGB1によって誘導される炎症反応を抑制する機能を有する抗炎症性DAMPsである可能性が示唆された。さらに、これらの抗炎症性DAMPsの作用はAGEsの共存によって抑制される可能性が示唆された。このことは、生体内にAGEsが蓄積した条件下においては、本来生じるべき抗炎症性DAMPsの作用が阻害され、DAMPsによる炎症が制御不全に陥り、炎症の慢性化や増悪化につながる可能性を示唆している。これらのことから、DAMPsと抗炎症性DAMPsの病態生理学的な作用を考える上では、生体内におけるAGEsの生成や蓄積について知見を得る必要があると考えた。そこで、リコンビナントGL01を用いた活性測定系を確立し、GL01の活性を変化させる分子の探索を行った。その結果、nordihydroguaiaretic acid (NDGA) という化合物が、GL01の活性を強く抑制することを見出した [7]。

この解析の過程で、NDGAを用いて培養細胞に強制的にAGEsを蓄積させる系を確立することができた。今後、この系を用いてAGEs蓄積がDAMPsと抗炎症性DAMPsの作用に与える影響を検証することを予定している。

<引用文献>

- [1] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Differential contribution of possible pattern-recognition receptors to advanced glycation end product-induced cellular responses in macrophage-like RAW264.7 cells. *Biotechnol Appl Biochem*, Vol. 67, No. 2, pp. 265-272 (2020)
- [2] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Advanced Glycation End Products Attenuate the Function of Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis to Regulate the Inflammatory Response. *Mol Cell Biochem*, Vol. 434, No. 1, pp. 153-162 (2017)
- [3] Watanabe M, Toyomura T, Tomiyama M, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Advanced glycation end products (AGEs) synergistically potentiated the proinflammatory action of lipopolysaccharide (LPS) and high mobility group box-1 (HMGB1) through their direct interactions. *Mol Biol Rep*, Vol. 47, No. 9, pp. 7153-7159 (2020)
- [4] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Identification of ribosomal protein L9 as a novel regulator of proinflammatory damage-associated molecular pattern molecules. *Mol Biol Rep*, Vol. 49, No.4, pp. 2831-2838 (2022)
- [5] Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Cationic ribosomal proteins can inhibit pro-inflammatory action stimulated by LPS+HMGB1 and are hindered by advanced glycation end products. *Biotechnol Appl Biochem*. Vol. 71, No. 2, pp. 264-271 (2024)
- [6] Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. Vol. 66, No. 1, pp. 486-91 (1998)
- [7] Watanabe M, Toyomura T, Ikegami R, Suwaki Y, Sada M, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S. Nordihydroguaiaretic acid inhibits glyoxalase I, and causes the accumulation of methylglyoxal followed by cell-growth inhibition. *Mol Biol Rep*, Vol. 49, No. 11, pp. 10499-10507 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Ikegami Ryo, Suwaki Yui, Sada Minami, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro, Mori Shuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Nordihydroguaiaretic acid inhibits glyoxalase I, and causes the accumulation of methylglyoxal followed by cell-growth inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 10499 ~ 10507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-07929-6	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 Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S.	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of ribosomal protein L9 as a novel regulator of proinflammatory damage-associated molecular pattern molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 2831-2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-021-07096-0	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 Watanabe Masahiro, Toyomura Takao, Wake Hidenori, Nishinaka Takashi, Hatipoglu Omer Faruk, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro, Mori Shuji	4. 巻 71
2. 論文標題 Cationic ribosomal proteins can inhibit pro inflammatory action stimulated by LPS+HMGB1 and are hindered by advanced glycation end products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology and Applied Biochemistry	6. 最初と最後の頁 264 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bab.2538	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 西中崇, ハティポール オメル ファルク, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 抑制性DAMPsとしてのリボソーム構成分子RPL9の同定
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 西中崇, 逢坂大樹, 王登莉, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 新規AGEs結合分子AGE-BP2がDAMPsの作用に与える影響の解析
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021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	豊村 隆男 (Toyomura Takao) (40425137)	就実大学・薬学部・准教授 (35307)	
研究分担者	森 秀治 (Mori Shuji) (50220009)	就実大学・薬学部・教授 (35307)	

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