

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 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590288

研究課題名（和文） 抗炎症タンパク質の新機能の解析

研究課題名（英文） Analysis of new function of anti-inflammatory protein

研究代表者

佐藤 英介 (SATO EISUKE)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60211942

研究成果の概要（和文）：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ある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 Annexin 1 の生理機能を解析した。その結果、NF- κ B のサブユニットである p65 と結合することが判明した。さらに、新しい好中球の機能である細胞外トラップにおける Annexin 1 の機能を解析し、細胞外へ DNA と結合して放出されることがあきらかとなった。

研究成果の概要（英文）：The anti-inflammatory protein annexin-1 is a potent mediator of inflammation resolution and a 37-kDa member of the annexin family of calcium and phospholipid-binding proteins, expressed constitutively in many cells, including neutrophil. The purpose of this study was to investigate the effect of annexin-1 protein as an endogenous regulator of anti-inflammatory effect and extracellular traps. Annexin 1 directly bound to p65 of NF- κ B. Annexin 1 also released to extracellular space with nuclear DNA during formation of extracellular traps.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：アネキシン1、活性酸素、アポトーシス、ネクロトーシス、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、糖尿病やがんなどにとどまらずアレルギー病態など、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、生体へのこれらラジカル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、活性酸素、一酸化窒素 (NO) の量と質あるいは好中球の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、皮膚アレルギーの薬剤としても用いら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である。これまで本蛋白が、細胞内でフォスホリパーゼA₂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が明らかとなった。さらに、下垂体、視床下部でのフォルミルペプチドの受容体の発現が明らかになり、アネキシン1がこの受容体にも結合して視床下部-下垂体-副腎軸での内分泌制御に関わる新たな可能性が指摘されつつある。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実験データも得られた。

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。アネキシン1のN末端のペプチドはフォルミルペプチドの受容体を介して作用するがその全貌は明らかにされていない。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、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。さらに、好中球の新しい生体防御機能である細胞外トラップにける役割を解析した。
- 3) Yeast Two-hybrid法により、アネキシン1と結合するKLHL5を検出した。本タンパク質は細胞骨格タンパク質として分布すると共にレドクス制御に関与するNrf2-Keap1のKeap1と相同性を持つ。従って、アネキシン1とKLHL5の結合が細胞骨格タンパク質の機能およびレドクス制御に関与する可能性を明らかとし、フォスホリパーゼA₂抑制以外の本タンパク質の細胞内での機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) アネキシン1と好中球の相互作用の解析
アネキシン1は現在アポトーシス細胞を検出するために使用されているアネキシンVのファミリーであるが、アネキシンVとはN末

端構造が異なる。アネキシン1は細胞内では刺激依存性に上昇した細胞内Ca⁺依存性に蛋白のコア部分である4回の繰り返し構造の領域が細胞膜内側に局在する酸性リン脂質であるフォスファチジルセリン(PS)に結合する。本結合様式は、アネキシンVがアポトーシス細胞の細胞表面に露出された酸性リン脂質(PS)に結合する様式と同じである。アネキシン1もアポトーシス細胞にコア領域で結合する。しかし、解析の結果、PSを外側に露出していない好中球の細胞外側にアネキシン1が結合することが明らかとなった。従って、N末端領域で結合する可能性が考えられる。そこで、以下の解析を行う。

- ① アネキシン1の好中球との相互作用を行うアミノ酸配列を解析すべく図に示すペプチド(Ac1-26, Ac1-12, Ac13-26)と完全長のアネキシン1およびN末の欠損したCOREアネキシン1をin vitroトランスレーションで作成する。
- ② これらのペプチド、蛋白が好中球に結合するか否かを免疫蛍光法にて顕微鏡下、およびフローサイトメトリーを用いて詳細に解析する。

N末の配列にはCキナーゼなどでリン酸化されるアミノ酸があり、刺激物に依存して細胞外に放出されるアネキシン1がリン酸化されている可能性は高い。そこで、リン酸化されたペプチドを用いて好中球の結合性が変化するか否かを解析する

- 3) アネキシン1の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か否かの解析は全く行われていない。この際的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。

4. 研究成果

平成 22 年度

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ているが、その機構は明らかにされていない。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 Annexin 1 もステロイドにより発現誘導される抗炎症蛋白であるが、その生理機能は明らかでない。Annexin 1 の生理機能を解析するため、本研究では、その細胞内結合タンパク質を同定し、その機能を解析した。Annexin 1 結合タンパク質は抗 Annexin 1 特異抗体を用いた免疫沈降法により検出した。特に、Annexin 1 Tg マウスにエンドトキシンショックを誘導して、炎症時に特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。エンドトキシンショックにより Annexin 1 の発現が上昇するが、これまで同定してきたタンパク質と違う新たな結合蛋白質を検出した。免疫沈降法により、NF-κB のサブユニットである p65 と結合することが判明した。p65 は、Annexin 1 と結合し、その核移行が阻害される傾向がみられた。したがって、アネキシン 1 Tg マウスがエンドトキシンショックでの生存性が高いことやサイトカインの放出が低いのは、これらの結合が背景にあるものと考えられた。今後、結合性のメカニズムを詳細に検討することでアネキシン 1 の抗炎症機構の解明につながると考えられる。

平成 23~24 年度

好中球は活性酸素を産生するだけでなく、近年、新しい生理機能として、extracellular trap をおこして生体防御機能をはたすことも知られている。本年度は、好中球でのアネキシン 1 の発現が、麻酔薬により増強することおよび好中球の新しい生理機構である extracellular trap におけるアネキシン 1 の機能を解析した。麻酔薬として、プロポフォールを用いた。培養細胞である HL-60 細胞に添加し、その発現の海を解析した。さらに、好中球は、末梢血好中球および口腔内好中球を健常人から採取し使用し、刺激あるいは無刺激下でのアネキシン 1 の発現および extracellular trap におけるアネキシン 1 の分布を解析した。エンドトキシンによりアネキシン 1 の培養細胞内での発現が上昇するが、麻酔薬であるプロポフォールを前処理するおアネキシン 1 の発現が増強され、炎症性サイトカインの発現は低下した。従って、プロポフォールは、抗炎症タンパク質を誘導し、炎症ストレスを軽減させる可能性が示唆された。また、extracellular trap におけるアネキシン 1 の分布を解析した結果、extracellular trap の進行にともないアネキシン 1 の分布は、一度核に移行し、その後、

細胞外へと放出されることが判明した。以上の結果から、アネキシン 1 の抗炎症機構の解明につながると考えられる。

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 18 件)

- 1) Hiramoto K, Kobayashi, H., Sato EF, Inoue M. (2010). Increased alpha-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) levels and melanocortin receptors expression associated with pigmentation in an NC/Nga mouse model of atopic dermatitis *Experimental Dermatology* 19(2): 132-6
- 2) Hashimoto, M., Sato, EF., Hiramoto, K., Kasahara, M. Inoue M (2010). Role of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in the Modulation of Pollinosis induced by Pollen Antigens. *Allergology International* 59(): 201-206
- 3) K Hiramoto, Y Yamate, K Orita, M Jikumaru, E Kasahara, EF. Sato, S Tamura & M Inoue (2010). Prevention of scattered light-induced asthenopia and fatigue by a polarized filter *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* 26(2): 89-92
- 4) K Orita, K Hiramoto, R Inoue, E.F. Sato, Hi Kobayashi, M Ishii, M Inoue (2010). Strong exercise stress exacerbates dermatitis in atopic model mice, NC/Nga mice, while proper exercise reduces it *Experimental Dermatology* 19(12): 1067-1072
- 5) K Miyamoto, EF. Sato*, H Tabata, M Katsuragi, K Hiramoto, E Kasahara, and M Inoue (2010). Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes and their mitochondria *Free Radical Biology and Medicine* 49: 674-681
- 6) T Kanazuru, EF. Sato, K Nagata, H Matsui, K Watanabe, E Kasahara, M Jikumaru, J Inoue and M Inoue (2010). Role of hydrogen generation by *Klebsiella pneumoniae* in the oral cavity of human subjects *The Journal of Microbiology* 48(6): 778-783
- 7) Hiramoto K, Hashimoto M, Orita K, Jikumaru M, Sato EF, Inoue M. (2010). Alpha-melanocyte-stimulating hormone plays an important role in the onset of pollinosis in a pollen allergy mouse model. *Int Arch Allergy Immunol.* 153(1): 13-8
- 8) M Takatsuka, M Osada-Oka, E Satoh, K

Kitadokoro, Y Nishiuchi, M Yoshimura, M Inoue, K Iwai, T Arakawa, Y Shimoji, H Ogura, K Kobayashi, A Rambukkana, S Matsumoto (2011). A major protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction PLoS One 6(6): e20985

9) Yamate, Y., Hiramoto, K., Sato, EF, Inoue, M. (2011). Ultraviolet-A irradiation to the eye modulates intestinal mucosal functions and properties of mast cells in the mouse Photochemistry and Photobiology 87(1): 191-198

10) Hiramoto K, Orita K, Yamate Y, Sato EF, Okano H, Nishikawa K, Inoue M. (2011). Plasma cluster ions decrease the antigenicity of mite allergens and suppress atopic dermatitis in NC/Nga mice. Arch Dermatol Res 303(5): 367-70

11) Hayashi T, Tanaka S, Hori Y, Hirayama F, Sato EF, Inoue M. (2011). Role of mitochondria in the maintenance of platelet function during in vitro storage. Transfus Med. 21(3): 166-74

1 2) Hara, K., Kasahara, E., Takahashi, N., Konishi, M., Jikumaru, M., Inoue, J, Kubo, S., Okamura H., Sato, EF., Inoue, M. (2011). Mitochondria determine the efficacy of anti-cancer agents that interact with DNA but not the cytoskeleton Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 337(3): 838-845

1 3) Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Hara K, Takahashi N, Konishi M, Sato EF, Matsumoto S, Okamura H, Inoue M. (2011). Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett. 585(14): 2263-8

1 4) Hiramoto K, Sato, EF (2012). Ultraviolet B radiation to the eye induces pigmentation in the epidermis via the activation of the subunit gp91 phox of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Clin Exp Dermatol 37(1): 65-67

1 5) Hong JY, Kwon SS, Kim GH, Kim JW, Sato E, Cho KH, Shim EB. (2012). Computational modeling of apoptotic signaling pathways induced by cisplatin. BMC Systems Biology 6(1): 122

1 6) Hiramoto K, Yamate Y, Kobayashi H, Ishii M, Miura T, Sato EF, Inoue M. (2012). Effect of the smell of Seirogan, a wood creosote, on dermal and intestinal mucosal

immunity and allergic inflammation. J Clin Biochem Nutr. 51(2): 91-5

1 7) Hiramoto, K; Kobayashi, H; Yamate, Y; Ishii, M; Sato, E (2012). Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation Experimental Dermatology 21(12): 911-4

1 8) Hiramoto K, Yamate Y, Kobayashi H, Ishii M, Sato EF, Inoue M (2013).

Ultraviolet B irradiation of the mouse eye induces pigmentation of the skin more strongly than does stress loading, by increasing the levels of prohormone convertase 2 and

-melanocyte-stimulating hormone. Clin Exp Dermatol. 38(1): 71-6

[学会発表] (計 4 件)

1) 佐藤英介:生殖現象における活性酸素代謝とミトコンドリアの役割 (2011) 第 32 回日本炎症・再生学会

2) 佐藤英介:排卵におけるミトコンドリアと活性酸素代謝 (2012) 第 30 回日本受精着床学会

3) EF Sato, et al. : Characterization of extracellular traps of oral neutrophils. 16th SFRRI meeting in London.

4) Imada I, EF Sato et al. Effect of lipid peroxidation in rat liver mitochondria and its regulation. 16th SFRRI meeting in London

[図書] (計 1 件)

EF Sato, M Hashimoto, M Inoue(2012) Analysis of Immunological reactions to Nanoscale Foods: Possible occurrence of Allergic reaction to nanoscale Food Particles. A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences” 305-309, Eds D Bagchi, M Bagchi, H Moriyama, F Shahidi.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英介 (SATO EISUKE)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号: 60211942