

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590587

研究課題名(和文) ネクローシスDNA断片化の意義 酸化ストレスと免疫反応の制御

研究課題名(英文) Significance of necrosis DNA fragmentation under oxidative stress and immune response

研究代表者

水田 龍信(MIZUTA, RYUSHIN)

東京理科大学・生命医科学研究所・准教授

研究者番号：50297628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス下で産生される低分子アルデヒドのアクロレインは、アセトアミノフェン誘導性肝障害の増悪因子であることが、特異的な抑制剤を用いた実験から明らかになった。また、ネクローシスDNA断片化酵素DNase は、DNase と強調し、DNA分解による死細胞の速やかな除去と隔離により、アクロレインによる損傷を抑制するが、DNase 遺伝子欠損マウスの解析から明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using specific inhibitors, we revealed that Acrolein, a low molecular-weight aldehyde produced under oxidative stress, is an exacerbation factor of acetaminophen-induced liver failure in mouse. From the analysis of DNase gene knock-out mouse, we also found that DNase cooperates with DNase I in inhibiting the liver failure by accelerating DNA degradation and sequestration/removal of dead cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ネクローシス DNA断片化 酸化ストレス 自己免疫疾患 SLE

1. 研究開始当初の背景

細胞死は大きくアポトーシスとネクローシスの二つに分類される。細胞死の際の 180bp の DNA 断片化はアポトーシスの指標とされている。我々はこれまで、アポトーシス時に見られるのと同様の DNA 断片化がネクローシスの際にも見られることがあり、それを司っている酵素の一つが DNase であることを明らかにしてきた。DNase は DNase ファミリーに属する分泌蛋白で、DNase と同様にネクローシス細胞の DNA の分解に関与すると考えられているが、局在も含め、使い分けに関しては明らかになっていなかった。生体内での DNase の機能を解析するために DNase 遺伝子欠損マウス (KO マウス) に解熱鎮痛剤アセトアミノフェンを大量投与し、肝細胞ネクローシスを誘導したところ、野生型マウスに比べ KO マウスでは感受性が亢進していた。アセトアミノフェンによる肝障害の原因としては、アセトアミノフェン代謝産物 N-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) によるグルタチオンの枯渇と、その結果生じる酸化ストレスが原因と言われてきたが、その実体に関しては不明な点が多かった。我々のこれまでの解析の結果、酸化ストレスに伴い細胞内で産生される低分子量不飽和アルデヒドであるアクロレインが肝障害の原因の一つである可能性が示唆された。しかしながら、アクロレインによる肝毒性と、DNase による DNA 断片化の関係については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

酸化ストレスに伴い細胞内で産生される低分子量不飽和アルデヒドであるアクロレインがアセトアミノフェンによる肝障害の原因の一つであることを明らかにするとともに、DNase KO マウスのアセトアミノフェン感受性の原因を DNA 断片化の観点から考察すること、さらにはネクローシスの際の DNase と DNase の使い分けを明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

野生型マウスならびに DNase 遺伝子 KO マウスに解熱鎮痛剤アセトアミノフェンを大量投与して、肝細胞ネクローシスを誘導する。その際にアクロレインの阻害剤を同時に投与し、症状の改善の有無を検討する。解析には生化学的解析、組織染色、顕微鏡観察を行う。またマウス血清中の DNase と DNase 活性を別々に測定し、その作用の違いを検討する。

4. 研究成果

(1) 薬剤性肝障害におけるアクロレインの関与

アクロレインは酸化ストレスに伴い細胞内で産生される低分子量不飽和アルデヒドで

あるが、極めて細胞毒性が強い。アクロレインは反応性が高く、色々なタンパクと結合することが知られていて、特にタンパクのリジン残基に結合しやすく、それを認識する抗体も開発されている (抗アクロレイン付加物抗体)。この抗体を用いて肝臓ホモジネートのウェスタンブロット解析を行ったところ、アセトアミノフェン肝障害を誘導したマウスではアクロレイン付加タンパクの産生が増加していた。さらにアセトアミノフェン肝障害誘導時に、アクロレインの阻害剤である 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (MESNA)、システアミン、N-ベンジルヒドロキシルアミン (NBHA) を投与すると、いずれの阻害剤によっても、アセトアミノフェン誘導性肝障害は劇的に改善した。また培養細胞に対するアクロレインの細胞毒性も MESNA、システアミン、NBHA のいずれかの存在下では特異的に抑制されることから、薬剤性肝障害におけるアクロレインの関与は明らかである。これまでアセトアミノフェン誘導性肝障害の原因はアセトアミノフェンの代謝産物 NAPQI による細胞毒性が主たる原因と言われてきたが、実はこれは一次損傷の原因であり、さらなる損傷の拡大は、引き続いて生じる酸化ストレスと、その副産物であるアクロレインによる二次損傷に因ることが示唆された。アクロレインによる二次損傷は脳梗塞の場合でも起こることが知られていることから、広く一般的な壊死を伴う病気の場合、アクロレインによる二次損傷は必須と考えられる。したがって、アクロレイン阻害剤をうまく使うことにより重症化が防げる疾患がかなりあるのではないかと予想される。

(2) ネクローシス DNA 断片化酵素 DNase の生理的機能

アセトアミノフェンによる肝障害を誘導したマウスの肝組織染色を行うと、KO マウスではネクローシス細胞の核が残存し、死細胞の除去が遅延していた。また上記で用いた抗アクロレイン付加物抗体で免疫組織染色を行うと、壊死部位に一致してアクロレイン付加物を認めた。このことから、野生型マウスに比べて KO マウスでアセトアミノフェン肝障害が亢進するのは、アクロレインの産生原となっている壊死細胞が、除去されずにその場にとどまるためであろうと予測された。逆に野生型マウスでは DNA 断片化により核および細胞の崩壊と遊離が亢進し、壊死細胞の周辺細胞からの隔離によってアクロレインの拡散が防がれているものと考えられた。したがって DNase の生理的意義は、DNA 断片化による死細胞の速やかな除去と隔離により、二次損傷を抑制し、再生を促す点にあるものと思われる。また DNA 断片化により遊離するヌクレオソームにアクロレインが捕捉されて中和される可能性も示唆された。

(3) DNase と DNase の使い分け

DNase は DNase ファミリーに属する分泌蛋白で、DNase と同様に、ネクローシス細胞の DNA の分解に関与する。DNase と DNase、いずれの遺伝子の欠損によっても SLE 様の自己免疫疾患を発症することが、最近明らかになっている。DNase は血液中の主要な DNA 分解酵素であり、死細胞 DNA の分解を担っていることは良く知られている。これまでの我々の研究から、DNase も血液中に存在し、DNA の分解を担っていることが明らかになったが、DNase と DNase の使い分けに関しては不明な点が多かった。今回、我々は血液中に存在するこの二つの酵素の活性を、わずか 1 μ l の血清を使って簡単に区別できる方法を開発した。その結果、次の事実が明らかになった。ネクローシス初期の比較的クロマチンの変性が進んでいない状況にあっては、DNase がまずリンカー部位に作用してこれを切断し、DNA を断片化する。ネクローシスが進行し、プロテアーゼが働くようになるとヒストンが分解され、DNA が漏出する。すると今度は DNase が作用し、DNase によって断片化された DNA をさらに細かく分解する。すなわち、DNase と DNase には時間・空間的な使い分けがあり、段階的に作用することで死細胞 DNA が効率よく分解されていることが明らかになった。実際、生体内ネクローシス誘導系であるマウス薬剤性肝障害モデルやストレプトゾトシンによる膵臓細胞壊死モデルで検証すると、DNase 遺伝子改変マウスではネクローシスの際の DNA 分解が明らかに抑制されていた。

(4) ネクローシス研究の応用 牛乳房炎の早期診断法の確立

細菌感染に起因するウシ乳房炎は酪農経営に甚大な損失を与えていることから、その迅速な診断治療は酪農全体にとって最も重要な課題である。現在、乳房炎の診断には体細胞数 (SCC) の測定や、カリフォルニアマスタイティステスト (CMT) が用いられているが、簡便性や感度の点で改善の余地がある。また治療には抗生物質の投与が一般的であるが、残留性や薬剤耐性菌の出現が危惧されていて、抗生物質に代わる治療法の確立が期待されている。このためにも、新たな診断治療の標的の同定は喫緊の課題である。

核内蛋白 HMGB1 は、重篤なヒト炎症疾患、たとえば敗血症などの血清中の新規マーカーとして、最近注目をあびている分子である。HMGB1 は本来核内に在ってクロマチンの構造維持や転写制御を行っているが、細胞が傷害され、ネクローシスに陥った場合は細胞外へ漏出する。また炎症局所で活性化されたマクロファージや好中球は積極的に HMGB1 を放出し、さらに炎症を増悪させると考えられている。したがって HMGB1 は炎症誘発物質としての側面も有していて、炎症治療の標的として有望視されている。

我々はウシ乳房炎における HMGB1 の関与を

想定し、これまでに 8 頭の乳房炎牛と 4 頭の健常牛の乳汁を材料に ELISA 法で乳汁中の HMGB1 量の定量を行い、体細胞数と HMGB1 濃度には正の相関があることを明らかにしている ($n=12$, $r=0.98$) (Furukawa et al. *Vet Res Commun.* 2011)。今回さらに生黄色ブドウ球菌を 1 頭のウシの 1 分房に投与し、無処理分房と比較したところ、投与翌日から投与分房由来の乳汁中の HMGB1 量ならびに体細胞数の増加が認められ、HMGB1 量と乳房炎重症度の相関の再現性を確認することができた。乳汁中の HMGB1 は細菌感染で壊死した乳腺細胞と、浸潤した好中球由来と考えられ、乳房炎重症度を正確に反映しているものと考えられる。したがって HMGB1 はウシ乳房炎の早期診断マーカーとして、また治療の標的としても有望な分子であることが示唆された。

さらに HMGB1 量の定量には現在、市販の ELISA キットを用いているが、極めて高価であり、煩雑で時間もかかることから、簡便な方法の開発が急務である。そこで HMGB1 がヘパリンに結合することを利用し、ヘパリンビーズに結合させた HMGB1 を FACS で解析する方法を検討した。その結果、約 1 ng の HMGB1 が存在すれば FACS で解析できることが明らかになった。この感度は ELISA の感度に匹敵し、しかも反応時間も操作も ELISA に比べてはるかに簡略化でき、アッセイ方法としては有用な方法であると考えられる。

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 4 件)

Arai, T., Koyama, R., Yuasa, M., Kitamura, D., Mizuta, R. Acrolein, a highly toxic aldehyde generated under oxidative stress in vivo, aggravates the mouse liver damage after acetaminophen overdose. *BIOMEDICAL RESEARCH-TOKYO* 35 (6): 389-395, (2014).

Mizuta, R., Araki, S., Furukawa, M., Furukawa, Y., Ebara, S., Hayashi, K., Shiokawa, D., Tanuma, S., Kitamura, D. DNase γ Is the Effector Endonuclease for Internucleosomal DNA Fragmentation in Necrosis *PLOS ONE* 8(12) DOI: 10.1371/journal.pone.0080223 (2013).

水田龍信、菊佳男、尾澤知美、菅原和恵、林智人 ウシ乳房炎と乳汁中 HMGB1 蛋白 日本乳房炎研究会 Proceedings 17, 81-83 頁 (2013)

水田龍信、菊佳男、尾澤知美、松原朋子、林智人:乳汁中 HMGB1 蛋白量はウシ乳房炎重症度と相関する.日本乳房炎研究会 proceedings. 16, 29-31 (2012)

[学会発表](計 7 件)

水田龍信、小山諒、北村大介: DNase

と DNase I によるネクローシス DNA 断片化.
第 37 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年、11 月 27 日.

水田龍信、小山諒：ネクローシス DNA 断片化のメカニズム. 第 23 回日本 Cell Death 学会、東京医科歯科大学、東京、2014 年、7 月 18 日.

水田龍信：肝臓におけるネクローシス DNA 断片化のメカニズム、第 21 回肝細胞研究会、東京医科歯科大学、東京、2014 年、6 月 28 日.

荒井智也、小山諒、木島真理恵、北村大介、水田龍信：ネクローシスにおける DNA 断片化酵素の生理的役割. 第 36 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2013 年、12 月 4 日.

小山諒、荒井智也、木島真理恵、北村大介、水田龍信：アクロレインによる薬剤性肝障害の増悪. 第 36 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2013 年、12 月 4 日.

水田龍信、荒井智也、北村大介：Identification of necrotic DNA fragmentation. 第35回日本分子生物学会、福岡国際会議場、福岡、2012年、12月14日.

水田龍信、菊佳男、尾澤知美、菅原和恵、林智人：ウシ乳房炎と乳汁中 HMGB1 蛋白. 第17回日本乳房炎研究会学術集会、農林水産省共済組合 南青山会館、東京、2012 年、10 月 12 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 龍信 (MIZUTA RYUSHIN)

東京理科大学・生命医科学研究所・准教授
研究者番号：50297628