

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861722

研究課題名(和文)新規DAMPs HSPB8に着目した治療応用への挑戦

研究課題名(英文) Pilot studies for the anti-inflammatory therapy targeting newly discovered Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) family, Heat Shock Protein 27(HSPB8).

研究代表者

麻生 結子 (aso, yuiko)

大分大学・医学部・研究支援者

研究者番号：60635358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：重症臓器不全のメカニズムとして、細胞の構成成分の一部が重度の炎症において細胞外に放出され、炎症反応等の生体反応を生じさせることが報告されている。このようなタンパク質をDAMPsと呼び、現在までに数々の蛋白が報告されている。今回の研究では、新規にDAMPsとなりうるものがあるか否かを検索した。その結果、Heat Shock Protein 27が急性の重度炎症反応時に生じる臓器障害に関与していることが証明され、同種の治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Severe organ failure is caused by many inflammatory responses, one of which is mediated by host molecules known as Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs). DAMPs are released from cell inside and are mainly cytosolic or nuclear proteins, which initiate and exaggerate the tissue inflammations and damages. In this study, we investigated the new mediators acting as DAMPs, it is showed that Heat Shock Protein 27(HSPB8) is increased in lipopolysaccharide (LPS) treated rats. Recombinant HSPB8 induced acute lung injury. It is considered that HSPB8 is acting as DAMPs and that new anti-inflammatory therapy targeting HSPB8 may be effective for protecting severe organ failure.

研究分野：集中治療領域における重度臓器障害に対する新規メカニズムの解明と治療法の開発

キーワード：DAMPs Heart Shock Protein 27 急性炎症性反応 LPS 急性肺障害

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックの原因としては特定のサイトカインの過剰によるいわゆるサイトカインストームと呼ばれる病態が重要であり、多くの研究者がそのメカニズム解明のために解析を続けてきた。我々も血液凝固機構を制御することでサイトカインの産生抑制につながり、結果として臓器保護効果を示すことを見だし新しい治療法につながる可能性があるとして報告してきた。

一方、Wang らが 1999 年の Science にて、核タンパク質である High Mobility Group Box 1 (HMGB1) が敗血症性ショック患者において血清中に上昇し、病態形成において重要であることを示して以来、この HMGB1 等の生体由来催炎症性物質を Damage associated Molecular Patterns Molecules (DAMPs) と総称して、敗血症などの重度病態に寄与する重要な物質であるとの新たな概念が提唱され注目されている。我々も、敗血症等の重症病態における HMGB1 の各種臓器傷害への寄与やオートファジーとの関係を明らかにし、HMGB1 を制御することで、病態改善につながることを論文等にて多数報告してきた。

今回我々は、骨格筋や心筋等に分布し細胞内にてシャペロンとして働いている小分子の Heat shock protein beta-8 (HSPB8) に着目した。この HSPB8 には、近年の研究で細胞外に存在すると TLR4 への刺激作用があることが報告されている (J Immunol. 2006 ;176 : 7021-7.)。上述の通り HSPB8 には、HMGB1 同様に重度炎症反応時において、細胞外に放出されることから、DAMPs として作用する可能性があると考えに至り、この HSPB8 の役割を解明することで、新規の炎症反応時におけるメカニズム解明に役立つことが考えられた。さらに、敗血症を中心とした全身性炎症反応症候群での新たな治療ターゲットになりうる可能性が極めて高いとの考えに至り、今回新規に研究を開始することにした。

## 2. 研究の目的

HSPB8 は催炎症性を有することや重症病態において血清濃度が上昇することから、新規 DAMPs として重症病態に寄与している可能性が非常に高く、これらの生体内物質は、炎症が病態に関わる種々の疾患において、有効な治療ターゲットになる可能性が高いと確信しているが、今までこれらの物質に関して本研究領域にて検討された報告は存在しない。本研究では、敗血症患者の血液サンプルを中心に採取し新規 DAMPs 候補物質としての HSPB8 の解析を行い、これらの結果より新規 DAMPs である HSPB8 を制御することを目標とした新規治療法の提案を行い、全く新しい新規治療法の臨床応用へ道筋とし

たい。

今回の研究では、従来より知られている HSPB8 に関して、我々は新たに敗血症における重症化を起こす因子となっているかを検討し、更に敗血症性ショックの臓器障害の治療ターゲットとしての可能性を検討することである。今回の研究では、

a) 敗血症モデルにおいて HSPB8 の役割を明らかにする。

b) HSPB8 が臨床患者においても重要であることを証明する。

c) HSPB8 自身の細胞へのシグナル等の関与を明らかにする。

ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、ラット全身性炎症反応モデルにおける、HSPB8 の影響を検討し、重要臓器障害での役割を明らかにする。その後、細胞培養系を用いて、これらの物質の細胞内リン酸化に対する影響並びにサイトカイン・ケモカインに対する刺激作用を中心に検討することで、新規 DAMPs 候補の物質として HSPB8 の重要性を確認する。

今回の研究における検証項目としては以下の通りである。

1) LPS 投与時の肺組織の変化と血中 HSPB8 濃度の変化

2) リコンビナント HSPB8 投与による肺組織の変化

3) HSPB8 細胞培養液添加時のサイトカイン濃度変化

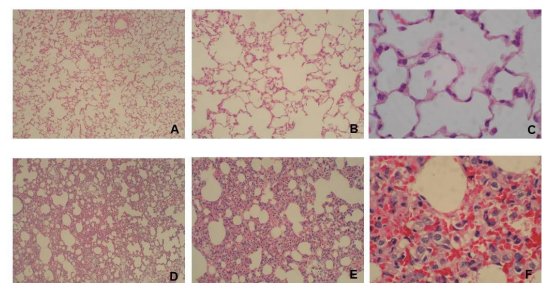
4) HSPB8 細胞培養液添加時の細胞内シグナルの変化

## 4. 研究成果

1) LPS 投与時の肺組織の変化と血中 HSPB8 濃度の変化

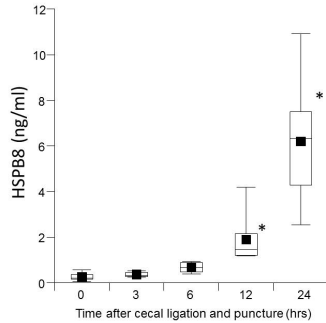
LPS 投与後 24 時間後の肺組織像を示す。上段

Figure 1



が正常ラットの肺組織像に対して、下段が LPS 投与 24 時間後の肺組織像である。炎症細胞の浸潤等の急性肺障害の像を呈している。

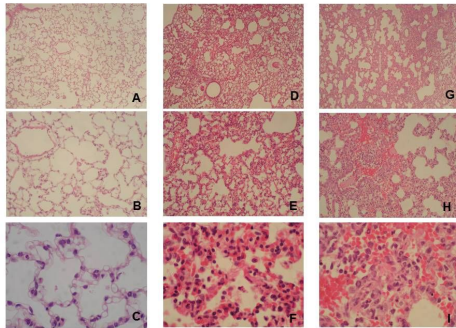
Figure 2



継時的な血清中 HSPB8 濃度を示す。LPS 投与 6 時間後より徐々に上昇し、12 時間後からは優位差をもって上昇し、24 時間後まで上昇を続けていた。

2) リコンビナント HSPB8 投与による肺組織の変化

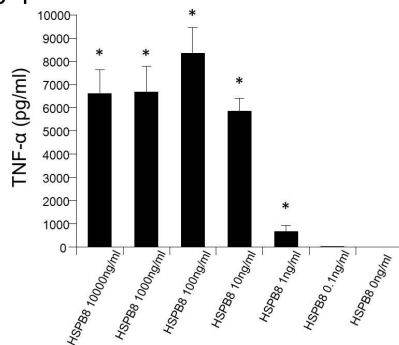
Figure 3



HSPB8 気管内投与時の肺組織変化を示す。一番右側の像は正常肺組織、真ん中は HSPB8 気管内投与 6 時間後、一番左側は HSPB8 気管内投与 24 時間後の肺組織像である。炎症細胞の浸潤等の急性肺障害の像を呈している。

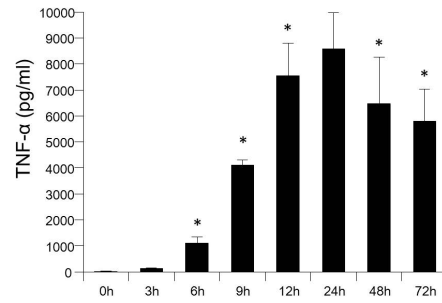
3) HSPB8 細胞培養液添加時のサイトカイン濃度変化

Figure 4



マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞に対して、リコンビナント HSPB8 を添加したときの 24 時間後上清中 TNF- $\alpha$  濃度変化を示す。1ng/ml を超えると TNF- $\alpha$  の誘導が生じ、100ng/ml を頂点に、増加した。

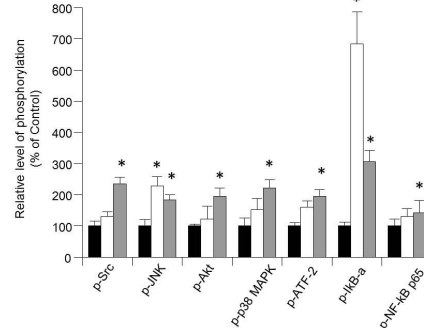
Figure 5



マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞に対して、リコンビナント HSPB8 100ng/ml 添加した際の継時的な上清中 TNF- $\alpha$  濃度変化を示す。添加 6 時間後より上昇をはじめ、24 時間後をピークに上昇を続けた。

4) HSPB8 細胞培養液添加時の細胞内シグナルの変化

Figure 6



マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞に対して、リコンビナント HSPB8 100ng/ml 添加した際の細胞内シグナルの変化を示す。細胞内シグナルとしては、I $\kappa$ B を中心に、上昇を認めた。

今回の研究において、

- ・新規 DAMPs として HSPB8 を発見したこと
- ・HSPB8 には催炎症作用があること
- ・HSPB8 には細胞内シグナルを介したサイトカイン誘導作用があることが証明された。重症臓器障害において、新規の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆されたと考えられ、今後の新規治療法開発につなげていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

麻生 結子 (Aso Yuiko)

大分大学・医学部・研究支援者

研究者番号：60635358

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：