

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293387

研究課題名(和文)新規致死性因子ヒストンによるインフラマソームの活性化機構の解析

研究課題名(英文)The analysis of inflammasome activation in extracellular histones

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症時において、細胞外ヒストンはDAMPsとして振舞う。しかしながら、その機能に関しては報告がない。今回、我々は「細胞外ヒストンがインフラマソームを活性化(インターロイキン-1(IL-1)の産生)する」を検証した。ヒストンはインフラマソームのアダプター分子のASCの存在の有無に関わらずIL-1を産生した。これらの結果より、細胞外ヒストンは敗血症の病態を進展することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, extracellular histones are damage-associated molecular patterns (DAMPs), which is released by necrotic cells. However, extracellular histones remain unclear as DAMPs. In this study, we focused whether extracellular histones activate inflammasome (IL-1 release) in macrophage cell lines, which are ASC in the presence or absence. Therefore, histones induced IL-1 in macrophage cell-lines in the presence or absence ASC, suggesting that sepsis might enhance in extracellular histones.

研究分野：医歯薬学

キーワード：敗血症 インフラマソーム ヒストン

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症の死亡頻度は心臓の鼓動の 3 心拍分である

世界の敗血症罹患者は年間約 2700 万人、その数は、大腸癌と乳癌の死亡者数以上である。その内、約 800 万人が死亡し、3 秒に 1 人が世界のどこかで敗血症により死亡している計算になる。したがって、敗血症の効果的な治療法の確立は急務である。

(2) 敗血症はインフラマソーム病である
インフラマソームは、カスパーゼにより炎症性サイトカインの成熟型 IL-1 β の分泌に関わり、炎症応答において中心的な役割を果たす細胞質内タンパク質複合体である。カスパーゼは、本来、アポトーシスに関与している。しかしながら、敗血症モデル動物にカスパーゼ阻害剤の効果があることは知られている。よって、敗血症はインフラマソームの活性化により病態の進展が示唆される。

(3) 敗血症致死性因子ヒストンは IL-1 β を産生する

ヒストンは、本来、N 末側のアセチル化、リン酸化等の修飾により、転写の場を提供し、生命維持に関わる遺伝子の発現制御を行っている。(細胞内(核))。最近、細胞外ヒストンが、敗血症の病態の増悪亢進に直接関与している事が判明した。具体的には、以下の 4 つが判明している。

- ① ヒストンの尾静脈投与は、マウスを 1 時間以内に肺血栓を誘発し死に至る。
- ② ヒストン H3、H4 は、血小板に作用し、凝集を惹起する。
- ③ ヒストン H2B は、プラスミノゲン受容体として、単球の血管外への浸潤を誘導する。

④ ヒストンは、IL-1 β を誘導する。

したがって、細胞外ヒストンは、内因性の damage associated molecular patterns (DAMPs) として最も危険な因子であり、敗血症の新規ターゲットである。よって、ヒストンの細胞外での機能の封じ込めが必須である。

(4) ヒストンの“悪の機能”の封じ込めは新規治療法の開発につながる

ヒストンの細胞外での働きは、細胞内の生命維持(善)とは真逆の振舞い(悪)をし、瞬く間に個体を死へ追いやる。このヒストンの作用は、全く新規であり、最近、最も注目されている。しかしながら、これらの機能を制御する系は未だに確立されていない。

したがって、本研究テーマは、ヒストンによるインフラマソームの活性化の解明と制御を行い、新規治療法への足がかりを行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全世界で 3 秒に 1 人が死亡する敗血症患者を助けることである。最近、新規敗血症の致死因子としてヒストンが注目されている。ヒストンは、本来、生命の維持に必須であるが、細胞外では、個体死、血小板凝集惹起などを引き起こし炎症性サイトカインとして振舞っている。よって、ヒストンの細胞外での制御は必須である。さらに、ヒストンがインフラマソームの活性化 (IL-1 β の産生) を研究代表者らは新たに見出した。しかしながら、ヒストンの細胞外での制御機構、インフラマソームの活性化などは未だ解決されていない。したがって、本研究は、致死因子ヒストンのインフラマソーム活性化の解明とヒストンの阻害因子の探索を行うことで敗血症の新規治療法の足がかりにあ

る。

3. 研究の方法

本研究は、細胞外ヒストンがインフラマソーム、すなわち、IL-1 β を産生するかを検証することである。

既に予備実験としてヒストンを添加するとIL-1 β が放出するのは確認している。よって、ヒストンがインフラマソームを活性化することが十分に示唆される。

(1) アダプター分子 ASC の検出

ASC はインフラマソーム活性化には必須なタンパク質である。したがって、はじめにASC の検出を行った。

①細胞 | J774A.1、RAW264.7

②検出方法 | ウェスタンブロット法

(2) ヒストンの IL-1 β の放出にアダプター分子 ASC を介しているか

本実験には2種類の細胞を用いた。J774A.1 と RAW264.7 細胞にヒストンを添加し、IL-1 β が産生されるかを検証する。

①ヒストンの刺激濃度 | 0.5~2.0mg/ml

②刺激時間 | 8 時間

③検出方法 | ELISA 法

4. 研究成果

(1) ASC の検出

2つの細胞 (J774A. 1、RAW264. 7) の ASC タンパク質の検出の結果、J774A. 1 は ASC が検出された。しかしながら、RAW264. 7 細胞は検出されなかった。したがって、これら2つの細胞を用いて、ヒストンによりインフラマソームの活性化の機能の解明を行う。

(2) インフラマソームの活性化

従来通り方法 (LPS、ATP 刺激) を用いて、2種類の細胞がインフラマソームを活性化するかを検討した。その結果、予想通り、J774A. 1 は IL-1 β を産生した。しかしながら、RAW264. 7 は検出されなかった。したがって、これらの細胞を用いることで、インフラマソームの関与を検証できる。

(3) ヒストンによるインフラマソームの活性化

上述の「3. 研究の方法」通りに実験を行った結果、驚くことに両細胞を共に IL-1 β の産生を、ヒストンの濃度依存的に確認した。

以上のように、ヒストン刺激によりインフラマソームの活性化を誘導した。ヒストンは2009年にエズモンらにより敗血症の致死因子として報告された。それ以来、様々な研究が行われた。しかしながら、インフラマソームとの関係に関しては乏しく、今回の検証が

初めてである。驚くことにヒストンはASCを介さないインフラマソームの活性化を誘導することが判明した。残念ながら、小動物での検証が行えなかった。今後、小動物での検証、臨床検体での関連性を行う予定である。

本研究において、ヒストンが敗血症の病態を進展する可能性が強く示唆された。

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9件)

- ① Liaw P, Ito T, Iba T, Thachil J, Zeerleder S
“DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC”
Blood Rev. 2016 Mar;30(2):149-55.
doi: 10.1016/j.blre.2015.10.002.
査読有り
- ② Morimoto-Yamashita Y, Kawakami Y, Tatsuyama S, Miyashita K, Emoto M, Kikuchi K, Kawahara K, Tokuda M. A natural therapeutic approach for the treatment of periodontitis by MK615.
Med Hypotheses. 2015 Nov;85(5):618-21.
doi: 10.1016/j.mehy.2015.07.028.
査読有り
- ③ Kohyama, M., Yabuki, A., Kawasaki, Y., Kawaguchi, H., Miura, N., Kitano, Y., Onitsuka, T., Rahmann, MM., Miyoshi, N., Yamato, O. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease) in a mixed-breed dog.
J Am Anim Hosp Assoc 51(6), 369-400, 2015 Nov. 査読有り
URL:http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6258?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&
- ④ Morishita, S., Kawaguchi, H., Ono, T., Miura, N., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Kato, H., Tanimoto, A., Nishino H.
Enteric lactoferrin attenuates the development of high-fat and high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Microminipigs.
Biosci Biotechnol Biochem. 2015 Nov 7:1-9
doi: 10.1080/09168451.2015.1091713.

- 査読有り
- ⑤ Otomaru, K., Fujikawa, T., Saito, Y., Ando, T., Obi, T., Miura, N., Kubota, C.
Diagnostic imaging of intra-abdominal cyst in heifer using the computed tomography.
Journal of Veterinary Medical Science, 2015. Oct 1;77(9):1191-3
doi: 10.1292/jvms.15-0153.
査読有り
- ⑥ Noguchi, M., Miura, N., Ando, T., Kubota, C., Hobo, S., Kawaguchi, H., Tanimoto, A.
Profiles of reproductive hormone in the microminipig during the normal estrous cycle.
In Vivo. 2015. 29(1):p.17-22.
URL:<http://iv.iijournals.org/content/29/1/17.long> 査読有り
- ⑦ Fujita H, Yagishita N, Aratani S, Saito-Fujita T, Morota S, Yamano Y, Hansson MJ, Inazu M, Kokuba H, Sudo K, Sato E, Kawahara K, Nakajima F, Hasegawa D, Higuchi I, Sato T, Araya N, Usui C, Nishioka K, Nakatani Y, Maruyama I, Usui M, Hara N, Uchino H, Elmer E, Nishioka K, Nakajima T.
The E3 ligase synoviolin controls body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1 β .
EMBO J. 2015 Apr 15;34(8):1042-55.
doi: 10.15252/embj.201489897.
査読有り
- ⑧ Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, Noguchi K, Ito T, Imamura T, Potempa J, Kikuchi K, Maruyama I.
Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients.
PLoS One. 2015 Feb 17;10(2):e0117775.
doi: 10.1371/journal.pone.0117775.
eCollection 2015.
査読有り
- ⑨ Sadamura-Takenaka Y, Ito T, Noma S, Oyama Y, Yamada S, Kawahara K,

Inoue H, Maruyama I.
HMGB1 promotes the development of pulmonary arterial hypertension in rats.
PLoS One. 2014 Jul 17;9(7):e102482.
doi: 10.1371/journal.pone.0102482.
eCollection 2014.
査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- ① 第103回日本獣医循環器学会
全血血栓形成観測システムT-TASを用いた心房細動モデル犬の心房血および末梢血における血栓形成能の経時的変化。
平尾大樹、山田修作、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹、岩永朋子、福島隆治。
札幌 2015. 12. 20.
- ② 第103回日本獣医循環器学会。
T-TASを用いたイヌの心房細動時における急性期の血液凝固能の評価
山田修作、平尾大樹、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、岩永朋子、三浦直樹、福島隆治。
札幌 2015. 12. 20.
- ③ 第103回日本獣医循環器学会
膝炎と肺高血圧症を併発した犬の全血血栓形成観測システムによる血小板&凝固能検査の可能性
岩永朋子、福島隆治、山田修作、平尾大樹、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹
札幌 2015. 12. 20.
- ④ 第38回日本分子生物学会年会第88回生化学会大会合同大会
細胞外ヒストンにおけるIL-1 β 放出機構の解明
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲 丸山征郎、川原幸一
神戸 2015. 12. 1.
- ⑤ 第64回九州地区獣医師大会
リン酸トラセニブとロムスチンの併用療法を試みた多剤耐性リンパ腫の犬5例
山崎裕毅、Lai Yu-Chang、澤真理子、川畑貴裕、矢吹映、瀬戸口明日香、三浦直樹
熊本 2015. 10. 16.
- ⑥ 第66回西日本生理学会
細胞外ヒストンによる炎症性サイトカインIL-1 β 放出機構の解明
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲、丸山征郎、菊池清志、川原幸一

- 久留米 2015. 10. 9.
- ⑦ 第158回日本獣医学会
低酸素培養条件下の犬リンパ腫細胞における生物学的活性の解析
山崎裕毅、Lai Yu-Chang、瀬戸口明日香、
越野裕子、中市統三、辻本 元、三浦直樹
東京 2015. 9. 8.
- ⑧ 第13回日本獣医がん学会。
縦隔型T細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の1例。
山崎裕毅、川畑貴裕、澤真理子、Lai Yu-Chang、矢吹映、三浦直樹、桃井康行。
東京 2015. 7. 5.
- ⑨ International Work Shop Symposium on Life Science
EXTRACELLULAR HISTONES ACTIVATE IL-1 β PRODUCTION IN MACROPHAGES.
Kae Oike, Ryota Katsuno, Yasuma Fujimoto, Tetsu Yasuda, Satoshi Noma, Takashi Ito, Salunya Tancharoen, Ikuro Maruyama, Ko-ichi Kawahara
Osaka 2014. 11. 16
- ⑩ 第36回日本血栓止血学会学術集会
新規致死性因子ヒストンは炎症性サイトカインIL-1 β を放出する
大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田哲平、井光、丸山征郎、川原幸一
大阪 2014. 5. 31

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号：20082282

中島 利博 (Nakajima Toshihiro)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：90620752

三浦 直樹 (MIURA, Naoki)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号：80508036

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：20381171

森元陽子 (Yoko Morimoto)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30437967