

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34606
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26460663
 研究課題名(和文) S100タンパク質トランスジェニックラットを用いた潰瘍性大腸炎発症機構の解析

 研究課題名(英文) Analysis of the mechanism responsible for the onset of ulcerative colitis using S100 transgenic rats

 研究代表者
 池本 正生 (Ikemoto, Masaki)

 天理医療大学・医療学部・教授

 研究者番号：80144385
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はS100A8 cDNAを組み込んだpCXGFPベクターをラットES細胞に注入し、S100A8トランスジェニックラット(F0)の樹立に成功した。その後、野生型Wistar rat (WT-rat)とTg-S100A8の腹腔内にLPSを投与したところ、WT-ratの肝組織に多数のマクロファージが集積し、急性肝障害が誘導されていた。一方、Tg-S100A8の肝組織障害は認められず、マクロファージの局在性は散在的であった。これらの結果は、S100A8がLPSによる肝障害を抑制している可能性を示唆している。
 現在、そのメカニズムの解明に向けて研究を進めている(投稿中)。

研究成果の概要(英文)：We artificially inserted S100A8 cDNA to the pCXGFP vector and then injected the resultant plasmid to embryonic stem (ES) cells of rats, and conclusively succeeded in having a S100A8 transgenic rat (Tg-S100A8). Lipopolysaccharide (LPS) was intraperitoneally administrated in wild-type rats and Tg-S100A8, so that acute liver damage has been induced in the liver tissue of WT-rats, where many macrophages have been also accumulated. While, acute liver damage in Tg-S100A8 was not almost observed, and immune cells were scattered in the liver tissue. These facts suggest that S100A8 could serve as an anti-inflammatory protein in Tg-S100A8. We are attempting to elucidate the mechanisms responsible for negatively regulating acute liver damage by LPS in Tg-S100A8.

研究分野：臨床病態学

キーワード：マクロファージ トランスジェニックラット 急性炎症 LPS S100タンパク質

研究課題

S100 タンパク質トランスジェニックラットを用いた潰瘍性大腸炎発症機構の解明

1. 研究開始当初の背景

S100 タンパク質、すなわち S100A8 及び S100A9 の免疫学的機能は、多くの研究者によって明らかになりつつあるが、その詳細は未だ不明な点が多くある。その中で、厚生省指定の難病である潰瘍性大腸炎 (UC) の発症とその後の病態変化にマクロファージの異常活性が深く関わっている可能性が報告された。しかし、そのメカニズムは現在でも未詳である。我々は本免疫細胞の主たるタンパク質である S100 タンパク質がその異常活性に関与している可能性を考えた。そこで、最初に S100A8 の免疫機能に焦点を当て、S100A8 トランスジェニックラット (S100A8-Tg) を樹立し、この S100A8-Tg を用いた in vitro 及び in vivo の実験を通して S100 タンパク質の免疫機能、ひいては UC 発症メカニズムの解明に繋がると考えたことが、着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

S100 タンパク質 (S100A8, S100A9 及び S100A8/A9) は、急性炎症の際、マクロファージが産生する急性炎症反応性タンパク質である (図 1)。しかし、それらの免疫機能は現在でも十分に解明されていないのが現状である。そこで、我々は S100A8-Tg の作製を試みる (図 2)、次に S100A8-Tg と野生型ラット (Wistar ラット: W-ラット) にリポポリサッカライド (LPS) を腹腔内に投与して誘導した急性肝障害モデルを通して、LPS 刺激後の肝組織内の急性変化をタンパク質及び遺伝子レベルで比較検討することにより、S100A8 の免疫学的機能を明らかにし、S100 タンパク質の免疫機能、ひいては UC 発症原因の解明を目的とする。

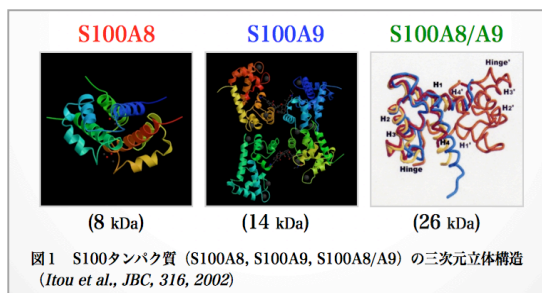


図1 S100タンパク質 (S100A8, S100A9, S100A8/A9) の三次元立体構造 (Itou et al., JBC, 316, 2002)

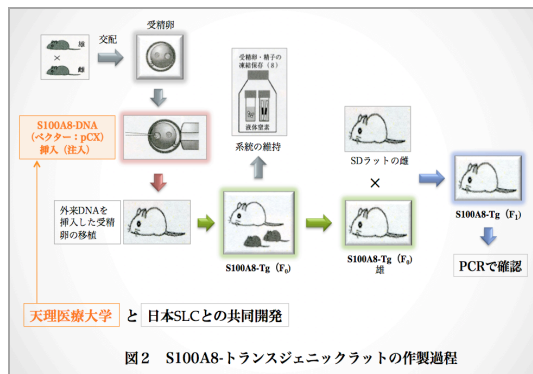


図2 S100A8-トランスジェニックラットの作製過程

3. 研究の方法

(材料)

S100A8-Tg 及び W-ラット (200~230 g/rat), Lipopolysaccharide (LPS, Sigma Co. Ltd.), リコンビナントラット S100A8 (r-S100A8) 及び r-S100A9, 抗 r-S100A8 モノクローナル抗体 (mAb-2H6, mAb8A6), 抗 r-S100A9 モノクローナル抗体 (mAb-1D11, mAb15E9), ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG (ヤギ) 抗体, ジアミノベンチジン 4-塩酸塩 (DAB), ビオチン標識キット (Dojindo Co. Ltd.), FITC 標識試薬, ビオチン標識 mAb-2H6, FITC 標識抗マウス IgG (ウマ) 抗体, Texas Red 標識ストレプトアビジン (STA-Texas Red), TRIzol 試薬, Super Script II Reverse Transcriptase (SS II RT), Fast SYBR Green Master Mix, S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β に対する各種プライマー (LifeScience Co. Ltd.), HE 染色用, S100A8 及び S100A9 測定用 ELISA キット (Yamasa Shoyu Co. Ltd.).

(方法)

- ① S100A8-Tg 及び W-ラットの腹腔内に LPS (10 mg/kg) を投与し急性肝障害を誘導した (約 24 時間)。心臓採血後に得られた血清は -80°C で保存した。同時に、それぞれのラットから肝組織を摘出し、その一部は 10% 中性ホルマリンで固定し、免疫組織染色用試料とした。
- ② LPS (2.5 mg/rat) を腹腔内に投与後 1 時間及び 1.5 時間後に心臓採血し、同時に、S100A8, S100A9 及び各種サイトカインに対する mRNA 測定用として、肝組織の一部を数カ所から無菌的に採取し、全 RNA を抽出した。
- ③ 肝組織のパラフィン切片を用いて HE 染色を実施し、肝組織に誘導された障害の程度を

顕微鏡下で観察した。一方, mAb2H6 及び mAb15E9 を用いて免疫染色 (DAB 及び蛍光) を行い, 肝障害の程度とマクロファージの局在性と S100 タンパク質の発現状態を蛍光顕微鏡下で観察した。

④ 血清中及び組織中の S100 タンパク質は我々が開発した ELISA により測定した。

⑤ SS II RT を用いた PCR により, 全 mRNA から S100A8, S100A9, IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β の一本鎖 cDNA を作製し, 遺伝子解析用試料とした。その後, Fast SYBR Green Master Mix を用いて, Real-Time PCR により各 cDNA の発現量を定量的に測定した。

なお, S100A8-Tg は特異的プライマーを用いて PCR により遺伝子レベルで確認した (日本 SLC による)。(図 3)

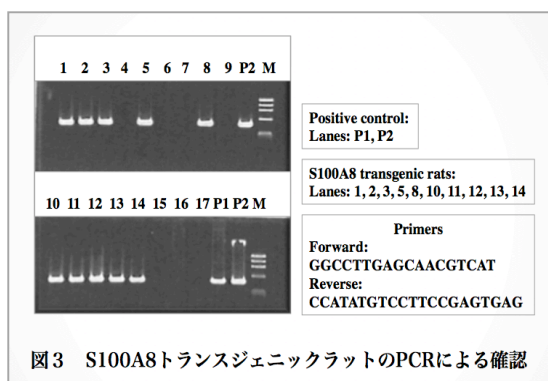


図3 S100A8トランスジェニックラットのPCRによる確認

4. 研究成果

① HE 染色による組織学的観察

LPS 投与後 24 時間では W-ラットの肝組織に急性肝障害が明らかに誘導されたが, S100A8-Tg の肝臓にはそのような急性変化はほとんど観察されなかった。(図 4)

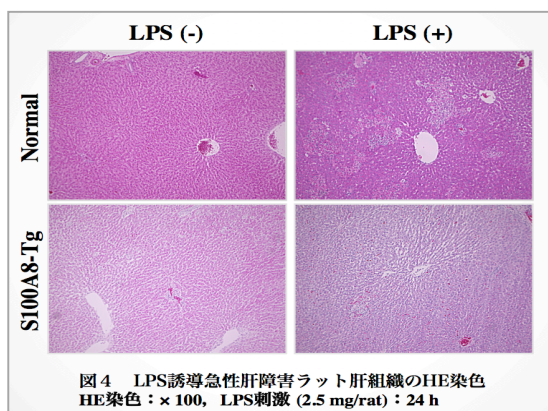


図4 LPS誘導急性肝障害ラット肝組織のHE染色
HE染色: $\times 100$, LPS刺激 (2.5 mg/rat) : 24 h

② 免疫染色

mAb2H6 及び mAb15E9 を用いて S100 タンパク質を産生する W-ラット肝組織中マクロファージを免疫染色 (DAB 染色) により特定し,

それらの分布を観察したところ, S100A8 及び S100A9 を発現した多数の免疫細胞 (マクロファージ) が炎症部位に集積していることを確認した。しかし, S100A8-Tg ではそのような免疫細胞はほとんど観察されず, S100 タンパク質陽性免疫細胞は明らかに少なく, かつ散在的であった。また, その局在性も散在的であり, ほとんどの陽性細胞は S100A8 及び S100A9 を同程度発現していたが (図 5), S100A9 がやや優位であった。

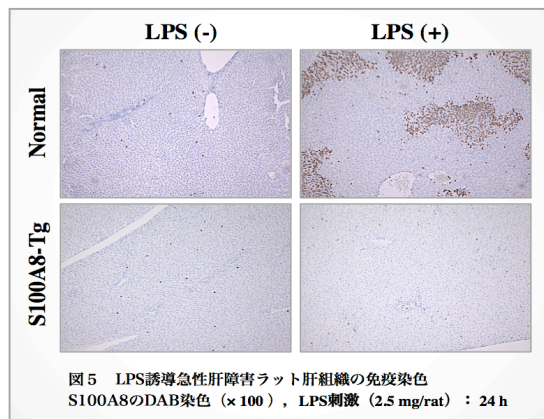


図5 LPS誘導急性肝障害ラット肝組織の免疫染色
S100A8のDAB染色 ($\times 100$), LPS刺激 (2.5 mg/rat) : 24 h

③ LPS 刺激後の mRNA の変動

LPS 刺激後 1 時間では, W-ラットの肝組織中における S100A8 及び S100A9 の mRNA はコントロールに対してヤック 2 倍程度誘導されたが, S100A8-Tg では処理前にすでに W-ラットの約 14 倍に達していた。LPS 刺激でもこの発現量はほとんど変化なかった。一方, LPS 刺激後 24 時間では, S100A9 の発現量は微量であったが, LPS 刺激後もほとんど変化なかった。しかし, S100A8 mRNA は未処理の S100A8-Tg において W-ラットより約 40 倍上昇し, さらに LPS 刺激 S100A8-Tg の場合, LPS 刺激後 W-ラットにおける発現量の 140 倍にも増加した。

④ 各組織中 S100A8 及び S100A9 の発現

未処理の W-ラット及び S100A8-Tg の肝臓, 肺臓, 腎臓, 心臓, 脾臓に含まれる S100A8 及び S100A9 を ELISA で測定した。その結果, S100A8 は肝臓においてわずかに検出されたが, その他の組織ではほとんど検出できなかった。それに対して, S100A9 は W-ラット及び S100A8-Tg の心臓及び腎臓における発現量は非常に低かったが, 肝臓, 肺臓, 脾臓では強く発現していた。

一方, LPS (2.5 mg/rat) で刺激した W-ラ

ット及び S100A8-Tg においては、S100A8 は肝組織においてわずかに検出されたが、その他の組織ではほとんど検出されず、未処理の場合とほぼ同様であった。それに対して、S100A9 は未処理の W-ラット及び S100A8-Tg いずれにおいても、肝臓、肺臓、脾臓において強く発現していたが、心臓と腎臓ではほとんど検出されなかった。しかし、LPS 刺激では、心臓と腎臓においても他の臓器と同程度存在していた。さらに、W-ラットの血清中には高濃度の S100A9 が検出されたが、S100A8-Tg の血清中ではほとんど検出されなかった。

次に、ヘテロダイマーである S100A8/A9 (カルプロテクチン) を ELISA で測定した。その結果、S100A8/A9 は肝臓、肺臓、脾臓において検出されたが、他の臓器ではわずかに検出されるにすぎなかった。

⑤ 各種サイトカインの変動について

W-ラット及び S100A8-Tg において、LPS 刺激後の各種サイトカイン mRNA (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β) の変化について検討した。その結果、LPS 刺激後 24 時間における mRNA は、W-ラット及び S100A8-Tg ともに大きな変動はなかった。現在、LPS 刺激後 1 時間及び 1.5 時間における S100 タンパク質及び各種サイトカイン mRNA の変化について検討中である。

以上の結果から、LPS によって W-ラットに肝障害が誘導され、その障害部位に S100A9 を優位に発現する免疫細胞 (主にマクロファージ) が集積した事実から、S100 タンパク質、とくに S100A9 は優れた肝障害マーカーであり、急性炎症性変化に深く関係する因子であると考えられた。一方、S100A8-Tg を用いた in vivo における実験において、肝障害がほとんど観察されない事実は、高発現している S100A8 が肝障害の発生を抑制的に制御する可能性を示唆している。そこで、これらの事実を明らかにするため、S100 タンパク質と各種サイトカインの mRNA を測定したが、大きな変動は確認されなかった。これは、半減期が短いため LPS 刺激後 24 時間では検出できなかったためと考えられる。

一方、W-ラット及び S100A8-Tg の主要臓器には、S100A8 はほとんど検出されず、S100A9 が豊富に含まれていたことは注目された。一般に、S100A9 は炎症誘導タンパク質と言われているが、LPS 刺激の S100A8-Tg ラットにお

いて、S100A9 が高濃度に存在しているにも係らず肝臓における炎症性変化がほとんど観察されなかった事実は、肝組織中のマクロファージが LPS を検知し、病的因子の侵入に対応する初期対応として S100A9 を分泌することによって生体防御に貢献している可能性が示唆された。しかし、分泌された S100A9 が過剰になることが予想される。その過剰分を S100A8 が S100A9 と複合体を形成することによって、S100A9 の分泌量を S100A8 が厳密に制御している可能性がある。

LPS 投与後 24 時間の肝組織においても S100A8-Tg の肝臓に炎症が誘導されないメカニズムは現在でも明らかでないが、刺激によって S100A8 が積極的に誘導され、炎症性因子と言われている S100A9 と複合体を形成することにより、炎症反応を間接的に制御している可能性が示唆された。

このように、S100A8 は急性炎症を抑制的に制御する急性炎症制御性タンパク質であり、S100A8-Tg は S100A8 の免疫学的機能を明らかにするための極めて貴重なモデルラットである。今後、S100A8-Tg を用いた in vitro 及び in vivo の実験系において、LPS 刺激後の情報伝達経路を詳細に解析し、そのメカニズムを解明したい。

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 3 件)

1. Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M. 2015. Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456: 415-420.
2. Okada K, Arai S, Itoh H, Adachi S, Hayashida M, Nakase H, Ikemoto M. 2016. CD68 on rat macrophages binds tightly to S100A8 and S100A9 and helps to regulate the cells' immune functions. *Journal of Leukocyte Biology* 100: 1093-1104.

- Shunsuke Sekiya, Makoto Murata, Satoshi Arai, Hiroshi Murayama, Atushi Kawasaki, Noriyuki Ashida, Kohki Okada, Masaki Ikemoto. Enzyme-linked immunosorbent assay for S100A9 in the stool of rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Immunol Methods*, 2016, 439(12): 44-9

[学会発表] (計 8 件)

- Okada K, Arai S, Itoh H, Adachi S, Nakase H, and Ikemoto M. CD68 on rat macrophages binds tightly to S100A8 and S100A9, and subsequently helps to regulate the cell's immune functions. 21st IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Paris Maillot, France, 2015.
- 岡田光貴, 荒井智, 戸田好信, 竹田真由, 仲瀬裕志, 池本正生. S100A8 及び S100A9 を指標とした潰瘍性大腸炎発症メカニズムの解析に関する研究. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, あわぎんホール, 2013.
- 岡田光貴, 荒井智, 戸田好信, 竹田真由, 仲瀬裕志, 池本正生. ラットマクロファージ免疫機構における S100A8 及び S100A9 のオートクライン的制御経路の可能性に関する研究. 第 54 回日本臨床化学会年次学術集会, 東京大学本郷キャンパス, 2014.
- 岡田光貴, 荒井智, 戸田好信, 竹田真由, 仲瀬裕志, 池本正生. CD68 を介した S100A8 及び S100A9 によるマクロファージ活性化機構に関する研究. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡国際会議場, 2014.
- 岡田光貴, 関屋俊介, 戸田好信, 池本正生, LPS 誘導急性肝障害ラットにおける S100 タンパク質の免疫機能に関する研究, 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会, 長良川国際会議場・岐阜都ホテル, 2015.
- 岡田光貴, 関屋俊介, 戸田好信, 池本正生, DSS 誘導潰瘍性大腸炎ラットの血清中において変動するタンパク質の同定及びそ

の臨床的意義について, 第 55 回日本臨床化学会年次学術集会, 大阪大学コンベンションセンター, 2015.

- 岡田光貴, 関屋俊介, 池本正生. S100 タンパク質による CD68 を介したマクロファージ活性化機構に関する研究, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本性化学会大会の合同大会, 神戸ポートアイランド, 2015.
- 岡田光貴, 荒井智, 関屋俊介, 池本正生. 炎症性腸疾患における血清 S100A8/S100A9 のバイオマーカーとしての意義. 第 56 回日本臨床化学会年次学術集会. くまもと県民交流館パレア, 2016.

[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:
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

池本 正生 (IKEMOTO, Masaki)
天理医療大学・医療学部・教授

研究者番号：80144385

(2)研究分担者

戸田 好信 (TODA, Yoshinobu)
天理医療大学・医療学部・教授
研究者番号：10444465

(3)研究分担者

仲瀬 裕志 (NAKASE, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60362498

(4)研究分担者

岡田 光貴 (OKADA, Kohki)
天理医療大学・医療学部・助手
研究者番号：80747569