

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462863

研究課題名(和文)新しいC5a受容体アンタゴニストの設計法の開発

研究課題名(英文)Development of a plan of the new C5a receptor antagonist

研究代表者

西浦 弘志(Nishiura, Hiroshi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90284760

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)：アポトーシスに誘導されたすべての細胞は、C5a受容体を発現し、そのアンタゴニスト・アゴニストリガンドであるリボソーム蛋白質S19多量体を産生・放出する。RP S19多量体の一つの結合配列がオートクリン作用で自アポトーシス細胞のC5a受容体に結合すると、アポトーシス誘導トランスクリプション因子デルタ型ラクトフェリンの活性化を介して、アポトーシス細胞死までの時間を短縮する。更に、RP S19多量体のもう一つの結合配列がパラクリン作用でマクロファージのC5a受容体に結合すると、細胞外カルシウム流入因子野生型アネキシンA3の活性化を介して、アポトーシス細胞の貪食処理までの時間を短縮する。

研究成果の概要(英文)：All apoptotic cells express C5a receptor or produce and release its antagonist/agonist ligand ribosomal protein S19 (RP S19) polymer. When one of binding motives of RP S19 polymer binds to the C5a receptor on apoptotic cells in an autocrine manner, a lifespan of apoptotic cells is shorten through an activation of an apoptosis-inducing transcription factor delta-type lactoferrin. Next, another binding motives of RP S19 polymer bind to the C5a receptor on macrophages in an paracrine manner, a phagocytic time of apoptotic cells is shorten through an activation of a calcium channel-opening factor wild-type annexin A3.

研究分野：実験病理学

キーワード：RP S19 C5a受容体 アポトーシス マクロファージ 貪食処理 急性炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性疾患局所では、特異的に発現する G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が奏でるオーケストラが問題視される(Br J Pharmacol. 2004; 142: 395-408)。GPCR の役割の確認には、800 種類の抗体とアンタゴニストが必要である。抗体は作製可能だが、インシリコ法によるアンタゴニスト作製に必須の結晶化が遅れている。そこで、新しいアンタゴニスト作製法の開発が急務である。

C5a 受容体アンタゴニストの現状は、国内では、共同研究者である岡田秀親先生が (元名古屋市立大学医学部)、独自のプログラムを開発した (J Immunol. 1996; 157: 4591-601)。海外では、共同研究者である Trent M. Woodruff 先生が(オーストラリア・クィーンズランド大学)、偶然に開発した (FASEB J. 2011; 25: 2447-2455)。しかし、これらの方法は他の GPCR アンタゴニスト調製法のヒントにはならない。

私は、関節リウマチの滑膜組織抽出液中の単球特異的走化因子(リボソーム蛋白質 S19 多量体: RP S19 多量体)を発見し、試験管内で下記の機能を発見した (J Biol Chem. 1996; 271: 878-882)。

C5a とは異なる C5a 受容体の第二リガンドである。

単球にはアゴニスト、好中球にはアンタゴニストとして作用する。

C5a の C 末端に RP S19 の C 末端の L131DRAGQVAAANKKH を連結させた C5a/RP S19 はアゴニスト・アンタゴニストとして作用する。

LDRIAGQVAAANKKH ペプチドは C5a 受容体アゴニスト・アンタゴニストとして作用する。

L131DR は C5a 受容体に結合する。

I134AGQVAAAN は細胞膜を貫通する。

K143KH はアゴニストとアンタゴニストの切り替えスイッチである。

さらに、急性炎症モデルマウス実験で、RP S19 多量体のアポトーシス関連機能を発見した (Apoptosis. 2010; 15: 966-981)。

アポトーシス細胞が RP S19 多量体を産生・放出する。

C5a 受容体を介してマクロファージがアポトーシス細胞を発見する。

C5a 受容体を介してアポトーシス細胞と好中球の細胞死までの時間が短縮する。

近年、C5a 受容体に結合しない変異 RP S19 多量体を産生するマウスを作製し、RP S19 多量体の生体での働きが判明した(投稿準備中)。

末梢リンパ球数が 1/3 に減少する。

胸腺のリンパ球と抗原提示細胞の接着が不良である。

誤産生された自己 IgM 抗体が糸球体へ沈着する。

ゆえに、ヒト対象疾患(原発性では免疫複合体が原因の膜性腎症と膜性増殖性糸球体腎

炎および続発性では膠原病性ループス腎炎と糖尿病性腎炎)での C5a 受容体の役割を確認するために、C5a 受容体アンタゴニストペプチドの調製は急務である。

既に、平成 24 および 25 年度の研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) 探索タイプの助成で、C5a 受容体アゴニスト・アンタゴニストペプチドが、急性炎症を消炎すると確認した。

2. 研究の目的

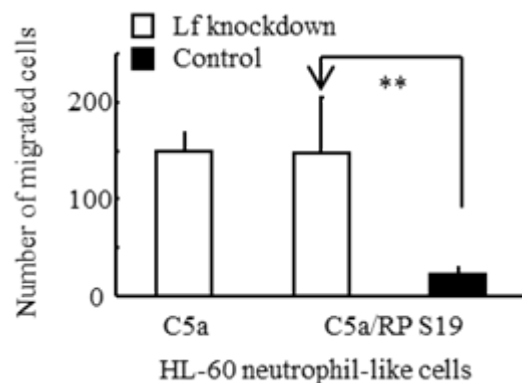
C5a 受容体アゴニスト・アンタゴニストペプチド(LDRIAGQVAAANKKH)の KKH が起動する好中球特異的アポトーシス促進因子を発見し、そのアポトーシス促進配列を決定する。その後、C5a 受容体アンタゴニストペプチド (LDRIAGQVAAAN-アポトーシス促進配列ペプチド)を調製し、急性炎症モデルマウスの消炎効果で評価する。

3. 研究の方法

好中球の C5a 受容体に結合後、C5a でなく C5a/RP S19 が結合するアポトーシス促進因子を沈降法で回収し、プロテオミクス法で同定する。さらに、アポトーシス促進機能配列を合成ペプチドで決定する。最後に、C5a 受容体アンタゴニストの消炎効果を評価する目的に、急性胸膜炎モデルマウスの病態改善を病理組織学的・分子生物学的に評価する。

4. 研究成果

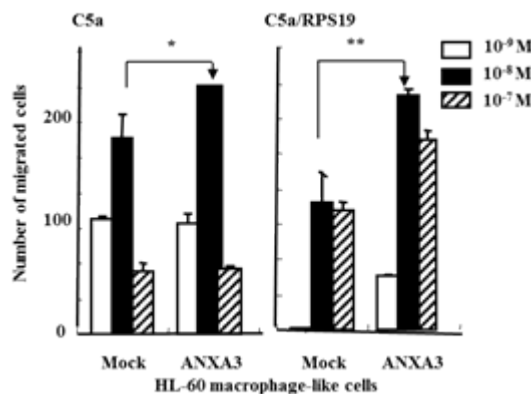
アポトーシスに誘導されたすべての細胞は、C5a 受容体を発現し、そのアンタゴニスト・アゴニストリガンドであるリボソーム蛋白質 S19 多量体を産生・放出する。RP S19 多量体の一つの結合配列がオートクリン作用で自アポトーシス細胞の C5a 受容体に結合すると、アポトーシス誘導トランスクリプション因子デルタ型ラクトフェリン (Lf) の活性化を介して、アポトーシス細胞死までの時間を短縮する。



(実験) ヒト白血病 HL-60 細胞はホルボールエステルで刺激すると、protein kinase C の活性化を介してマクロファージ様細胞に形質変化する。そこで、ANXA3 遺伝子を導入した HL-60 (HL-60^{ANXA3}) 細胞をホルボールエステルで刺激しマクロファージ様 HL-60ANXA3

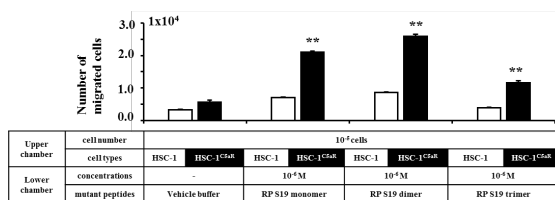
細胞を調整した。コントロール細胞と比較して、C5a 受容体のアゴニストリガンド C5a で誘導した細胞走化能は shRNA 導入で亢進されなかった。しかし、RP S19 多量体の機能体 C5a/RP S19 では亢進された。

更に、RP S19 多量体のもう一つの結合配列がパラクリン作用でマクロファージの C5a 受容体に結合すると、細胞外カルシウム流入因子野生型アネキシン A3 (ANXA3) の活性化を介して、アポトーシス細胞の貪食処理までの時間を短縮する。

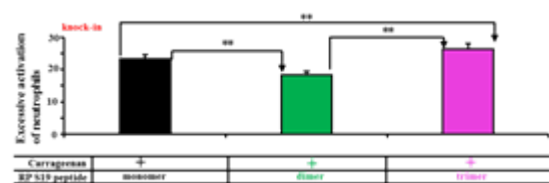


(実験) ヒト白血病 HL-60 細胞はホルボールエステルで刺激すると、protein kinase C の活性化を介してマクロファージ様細胞に形質変化する。そこで、ANXA3 遺伝子を導入した HL-60 (HL-60^{ANXA3}) 細胞をホルボールエステルで刺激しマクロファージ様 HL-60ANXA3 細胞を調整した。コントロール細胞と比較して、C5a 受容体のアゴニストリガンド C5a で誘導した細胞走化能は ANXA3 遺伝子導入で亢進された。この細胞走化能亢進率は、RP S19 多量体の機能体 C5a/RP S19 でも亢進された。

RP S19 ペプチド単量体を新たに調整し、アンタゴニスト・アゴニスト効果が細胞内の特異的因子によることが判明した。そこで、RP S19 ペプチド多量体を調製し、急性炎症モデルマウスの消炎効果を評価した。



(実験) ヒト扁平上皮癌 HSC-1 細胞は C5a 受容体を発現していない。そこで、C5a 受容体遺伝子を導入した HSC-1 (HSC-1^{C5aR}) 細胞を調整した。コントロール細胞と比較して、RP S19 ペプチド単量体で誘導した細胞走化能は二量体で亢進された。この細胞走化能亢進率は、RP S19 三量体で抑制された。



(実験) RP S19 多量体が形成されず、単量体のみが形成される Q137E 変異 RP S19 遺伝子ノックインマウスを作製した。コントロールマウスにカラゲニンを胸腔に投与すると、急性胸膜炎が誘導される。しかし、24 時間内に胸腔中の好中球はマクロファージで処理される。一方、ノックインマウスの胸腔中の好中球はマクロファージで処理されずに残存する。この実験条件で RP S19 ペプチド単量体、二量体および三量体を胸腔内に投与すると、二量体に最大の消炎効果が確認された。以上の結果から、RP S19 ペプチド二量体に最大の消炎効果があることが示唆された。これをプロトタイプとして、今後あらたな GPCR アンタゴニスト・アゴニストリガンドを作製予定である。

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7件)

The roles of a ribosomal protein S19 polymer in a mouse model of carrageenan-induced acute pleurisy. Yamanegi K, Kawakami T, Yamada N, Kumanishi S, Futani H, Nakasho K, Nishiura H. *Immunobiology*. 2017 May;222(5):738-750. doi: 10.1016/j.imbio.2017.02.001. Epub 2017 Feb 7 (査読有)

RP S19 C-terminal peptide trimer acts as a C5a receptor antagonist, H. Nishiura, T. Kawakami, M. Kawabe, N. Kato-Kogoe, N. Yamada, K. Nakasho, K. Yamanegi, *Biochem. Biophys. Reports*, 2016, 7(9), 70-76. (査読有)

Functional analysis of differences in transcriptional activity conferred by genetic variants in the 5' flanking region of the IL12RB2 gene. Kato-Kogoe N, Ohyama H, Okano S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nishiura H, Abiko Y, Terada N, Nakasho K. *Immunogenetics*. 2016 Jan;68(1):55-65. doi: 10.1007/s00251-015-0882-x. Epub 2015 Nov 9. (査読有)

The roles of ribosomal protein S19 C-terminus in a shortened neutrophil lifespan through delta lactoferrin. Nishiura H, Yamanegi K, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, Nakasho K. *Immunobiology*. 2015 Sep;220(9):1085-92. doi: 10.1016/j.imbio.2015.05.006. Epub 2015 May 11. (査読有)

Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. Yamanegi K, Kawabe M, Futani H, Nishiura H, Yamada N, Kato-Kogoe N, Kishimoto H, Yoshiya S, Nakasho K. *Int J Oncol*. 2015 May; 46(5) : 1994-2002. doi: 10.3892/ij.2015.2924. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25778932 (査読有)

Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor-. Kawabe M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, Yamada N, Yamanegi K, Nishiura H, Hirano H, Kishimoto H, Nakasho K. *Med Mol Morphol*. 2015 Sep; 48(3) : 169-76. doi : 10.1007/s00795-014-0094-8. Epub 2014 Dec 30. (査読有)

Annexin A3 plays a role in cytoplasmic calcium oscillation by extracellular calcium in the human promyelocytic leukemia HL-60 cells differentiated by phorbol-12-myristate-13-acetate. Nishiura H, Yamanegi K, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, Nakasho K. *Exp Mol Pathol*. 2014 Oct ;97 (2) : 241-6. doi : 10.1016/j.yexmp.2014.07.010. Epub 2014 Jul 16. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Nishiura H., Yamanegi K., Yamada N., and Nakasho K., A sjogren ' s syndrome-like condition in Gln137Gly RP S19 gene knocked-in C57BL/6J female mice. International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, 2016/August/21th-26th.

Nishiura H., Yamanegi K., Yamada N., and Nakasho K., Condition of Gln137Gly RP S19 gene knocked-in C57BL/6J female mice. the 26th International Complement Workshop, Kanazawa city, Japan, 2016/September/4th-8th.

西浦弘志, 山根木康嗣, 小越菜保子, 中正恵二. Gln137Glu 変異 RP S19 遺伝子ノックインマウスの病態. 日本病理学会総会, 仙台国際センター(宮城県, 仙台市) 2016 年 5 月 12-14 日

西浦弘志, 山根木康嗣, 小越菜保子, 中正恵二. 転移性エナメル上皮種の鑑別法. 日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市) 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日

西浦弘志, 山根木康嗣. 部分的細胞恒常性維持機構欠損の C57BL/6J マウス病態への影響. 日本臨床口腔病理学会総会,

北海道大学(北海道, 札幌市) 2016 年 7 月 29-31 日

山田直子, 山根木康嗣, 小越(加藤)菜保子, 西浦弘志, 中正恵二. 骨肉腫細胞における低酸素による細胞表面 MICA の発現低下. 日本分子生物学会, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市) 2015 年 12 月 1-4 日

山根木康嗣, 西浦弘志, 小越菜保子, 和唐雅博, 岡村友玄, 富永和也, 西川哲成, 田中昭男. 下顎歯肉に発生した隆起性病変. 日本臨床口腔病理学会総会, 北海道大学(北海道, 札幌市) 2016 年 7 月 29-31 日

山根木康嗣, 西浦弘志, 小越菜保子, 川邊睦記, 首藤敦史, 野口一馬, 岸本裕充, 中正恵二. 上顎に発生した骨肉腫の 1 例. 日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市) 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

西浦 弘志 (NISHIURA, HIROSHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90284760