

## 令和4年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	病の根源「DAMPs/PAMPs」を制御する Anti-DAMPs/PAMPs の網羅的機能解析と DAMPs/PAMPs 関連病態治療法開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部薬理学教室・和氣秀徳 共同研究者：医学部薬理学教室・高橋英夫、西中崇、ハイポール オムル ファルク 高度先端総合医療センター再生医療部・福田寛二、寺村岳士、竹原俊幸、小野寺勇太	

### 1. 研究目的・内容

本研究では様々な傷害組織・細胞から産生・放出されるダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns:DAMPs)(e.g. high mobility group box1 (HMGB1), Heme, Fe<sup>2+</sup>, IL-33, advanced glycation end products (AGE), polyphosphate (PolyP) 等) や感染細菌由来の病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns:PAMPs) (e.g. lipopolysaccharide (LPS), PolyP 等) による血液・血管系への影響を明らかにすると共に、Anti-DAMPs/PAMPs 因子としての histidine-rich glycoprotein (HRG) の血液・血管系保護効果の詳細なメカニズムの解明を目的として行う。これら DAMPs/PAMPs に関する研究を進めることは、多彩な DAMPs/PAMPs 関連病態の治療法開発に寄与する。

### 2. 研究経過及び成果

#### HRG の DAMPs 誘発血管内皮障害との関連性

溶血や組織傷害により細胞から遊離する 2 価鉄イオンは DAMPs の一つであると考えられている。2 価鉄イオンはフェントン反応を介したヒドロキシラジカル産生によって、血管内皮細胞を障害することは知られているが、直接的な作用は明らかになっていない。昨年度は、2 価鉄イオンが血管内皮細胞のミトコンドリア障害を誘導し、その結果産生されるスーパーオキシド等の活性酸素を介し、細胞膜脂質の酸化を誘導した後、細胞膜破綻による細胞死が引き起こされることを明らかにしていたが、本年度はミトコンドリア障害よりも前段階で起こる現象に関して調査を行った。2 価鉄イオンを血管内皮細胞に処置すると、2 価鉄イオンは急速に細胞内へ移行する。この急速な移行は細胞にとってストレスとなると考えられたため、我々はミトコンドリア障害の前に小胞体ストレス応答が引き起こされているのではないかと考えた。ウエスタンブロッティング法により、小胞体ストレス関連タンパク質(PERK, eIF2 $\alpha$ , ATF4, IRE1 $\alpha$ , ATF6)の活性に関して調査を行ったところ、2 価鉄イオンは早い物では刺激直後から小胞体ストレス関連タンパクを活性化させることが明らかとなった。また、HRG は、以前明らかにした 2 価鉄イオンによるミトコンドリア障害、細胞膜酸化、細胞死の抑制活性と同様に、小胞体ストレス応答も抑制することが明らかとなった。

さらに、PolyP と血管内皮障害との関係についても調査を行った。PolyP は DAMP として血小板より、PAMP として細菌から放出される因子であり、血小板から放出されるものはリン酸が 15 分子もしくは 70 分子程度連なったもの、細菌より放出されるものはリン酸が 1000 分子程度連なったもので、鎖長が異なるのが特徴である。昨年度、我々は、PolyP は鎖長が長いものの方が短いものより強く細胞死を誘導することを明らかにしていたが、今回、細胞間接着に関与する

VE-Cadherin の発現を PolyP は抑制することを明らかにした。また、HRG は PolyP による血管内皮細胞障害を抑制することも明らかにした。

#### HRG の IL-33 関連血管新生への関与

IL-33 はアレルギーへの関与がよく知られている炎症惹起物質であり、DAMPs の一種でもある。昨年度、再生フェーズにおける IL-33 の血管新生に対する影響を調べたところ、IL-33 単独による血管新生の誘導は引き起こされなかった。しかしながら、炎症・再生に非常に強く関与していることで有名なヒスタミンにより、血管新生が誘導され、IL-33 の発現誘導も引き起こされることを明らかにした。さらに、ヒスタミンは代表的な DAMPs の一種である HMGB1 の核内から細胞外へのトランスロケーションも誘導することが明らかになり、ヒスタミンは炎症・再生過程において、DAMPs を誘導する因子である可能性が示唆され、ヒスタミンと DAMPs さらに血管新生との関連が注目される。そこで、まず我々は、ヒスタミンによる血管内皮細胞管腔形成機構について調査を行った。血管内皮細胞株 EA.hy926 にヒスタミン刺激を行うと著明な管腔形成が誘導され、その経路として、VEGF や MMP の発現誘導が重要であることが明らかとなった。また、IL-33 のレセプターである ST2 の発現も亢進することが明らかとなった。ST2 の発現亢進は管腔形成を促進すると予想されたため、ST2 を RNAi 法によりロックダウンしたところ、予想に反して管腔形成を更に誘導する結果となった。

#### HRG の AGE 誘発血管新生への関与

高血糖状態の糖尿病において、タンパク質を非酵素的に糖化し、AGE が産生される。AGE は糖尿病性網膜症などの新生血管由来の合併症を誘発することが知られている。昨年度、AGE が血管新生を誘導することを確認し、フコイダンは AGE 誘導血管新生に関与するスカベンジャーレセプター (CD163、LOX-1) の発現を抑制することで血管新生を抑制することを明らかにした。しかしながら、HRG はこの血管新生に対して、抑制効果はなかった。HRG は糖尿病における血管新生由来の合併症の治療薬とはなりえないが、フコイダンは本病態の治療薬として利用できる可能性があることを示した。これら一連の研究に加えて、本年度は、PAMP としての病原体由来 DNA、もしくは DAMP としての自己 DNA を認識する細胞内パターン認識受容体 cGAS-STNG 経路に AGE が関与するかを調査した。cGAS-STNG 経路は DNA との結合により活性化された cGAS より cGAMP が合成され、STNG 経路を活性化し、IFN を介する生体防御反応を誘導する。単球系細胞株 THP-1 におけるこの経路は AGE3 によって CD36 を介して抑制されることを我々は明らかにした。この結果は、糖尿病における易感染性の一因であると考えられた。

#### HRG の術後運動療法効果判定及び筋肉状態把握のためのマーカーとしての可能性と Anti-DAMPs としての筋への関わり

運動は創傷治癒の促進効果があるといわれている。HRG は肝臓で合成され、血中に主に存在しているが、血液量が豊富な組織ということもあり、筋肉は HRG の貯蔵庫になっていると考えられている。創傷治癒過程において、運動により筋肉から全身に遊離した HRG が何らかの関係があることが示唆されるため、この関係性を検証する必要がある。今回は、マウス自由運動モデル実験を実施した。マウスを運動回転板を設置したケージに入れ、4 週間飼育した。毎日運動量(回転数)を計測したところ、平均して 10000~30000 回転させることが示された。また、体重は自由運動群と非運動群では有意な差は認められなかった。本題である HRG 血中濃度に関しても体重と同様に 2 群間に有意な差は認められなかった。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

2 価鉄の研究に関しては、小胞体ストレス応答からミトコンドリア障害へ至るシグナルが、不明な点が存在するため、このシグナルに関して研究を進める。  
PolyP 研究に関しては、VE-Cadherin の発現抑制という血管透過性の亢進を示唆するデータ得ているため、次年度は血管透過性に関する研究を行う予定である。  
IL-33 の研究では、ST2 の発現と管腔形成の関連性をより詳細に明らかにすると共に、IL-33 は炎症性サイトカインでもあるので、他の炎症性サイトカインとの関連性も調査する。  
AGE に関しては、血管内皮細胞における cGAS-STNG 経路と AGE との関連性を明らかにする。自由運動マウス実験においては、モデルマウスの各種臓器を採取してあるので、各種臓器中、特に筋肉中の HRG 濃度が運動によって変化があるか調査する。また、創傷部位の HRG の分布に関して、運動により変化があるかを確認する。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Life Sciences	(雑誌)	2022年10月24日
日本薬理学会	(シンポジウム、口頭、ポスター)	2022年11月30日~ 12月1日