

## 令和5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**

敗血症病態において、重篤な感染や全身炎症反応により引き起こされる血管内溶血により、赤血球から DAMP として 2 価鉄(Fe<sup>2+</sup>)が放出され、周囲の血管内皮細胞に障害を与えることが知られている。従って、2 価鉄の血管内皮細胞に対する作用機序を明らかにすることは、敗血症病態等の関連病態に対する理解を深め、創薬のための有用な知見となる。また Anti-DAMPs としての HRG の本反応に対する作用機序を明らかにすることは、HRG を DAMPs 関連病態治療薬として開発する上で必要となってくる。そこで、我々は、2 価鉄の血管内皮障害メカニズムの解明と HRG の治療効果に関して研究を行った。昨年度以前には、2 価鉄は、細胞内に流入すると、小胞体ストレス関連タンパク(PERK, eIF2α, ATF4, IRE1α, ATF6)を活性化させ、次に、ミトコンドリアの膜電位の低下、ミトコンドリア内スーパーオキシド産生、apoptosis-inducing factor の放出などのミトコンドリア障害関連反応を引き起こし、ミトコンドリアより放出された活性酸素が細胞膜脂質を過酸化することで細胞膜が傷害・破綻し、細胞死が引き起こされることを明らかにした。これら反応は HRG を処置することで完全に抑制された。また、この抑制反応は、HRG レセプターである CLEC1A に対するブロッキング抗体で阻害されなかったため、HRG は CLEC1A 以外のレセプターを介している可能性も示唆された。加えて、2 価鉄による血管内皮細胞死は、アポトーシス、パイロトーシス、ネクロプトーシス経路を阻害する阻害剤によって抑制されなかったことより、これら経路は本反応に関与しないことを明らかにし、2 価鉄による細胞死であり、報告されている鉄依存性細胞死フェロトーシスの経路と今回の血管内皮細胞死とで一致しない点もあるため、新たなフェロトーシス様細胞死である可能性が示唆された。昨年度は、小胞体ストレス応答とミトコンドリア障害間の更に詳細なシグナル伝達を明らかにした。すなわち、2 価鉄の細胞内流入により IRE1α がリン酸化し、ASK1 をリン酸化することで、Bax を活性化し、ミトコンドリアに孔を形成することでミトコンドリア障害を引き起こすことを明らかにした。また、

HRG の 2 価鉄血管内皮細胞障害抑制反応に関与する HRG レセプターを探索するため、我々が以前開発した HEK293 細胞表面共発現系レセプター探索システムを用いて、新たに候補受容体 10 種を同定した。

2 価鉄以外の DAMP/PAMP としてポリリン酸(PolyP)を用いた研究も行った。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。また、PolyP は敗血症病態進行に関与することも知られている。そこで、PolyP と血管内皮障害との関係についても調査を行った。昨年度以前には、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し、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。昨年度はさらに、PolyP による VE-Cadherin の発現抑制を HRG は阻害することを明らかにした。

### 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。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ことから、IL-33 は単独ではなく、その他の因子と複合的に作用していることが考えられる。そこで、炎症・再生に関与していることで有名なヒスタミンによる管腔形成に関して調査した。その結果、昨年度以前には、ヒスタミンを用いて、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 法によりノ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。次に、代表的な管腔形成誘導シグナルには VEGF を介した経路がよく知られているが、IL-33 では異なる経路に関与している可能性が高い。従って、VEGF 以外の管腔形成誘導シグナルを探索した。まず、ヒスタミンを用いた管腔形成は VEGF 以外では MMP を介した細胞外基質分解や H1 レセプターを介したダイレクトな細胞増殖に関与することを明らかにした。昨年度は、炎症反応への関与が知られる TNF- $\alpha$  による管腔形成についても調査を行った。TNF- $\alpha$  は血管内皮細胞上のインテグリン  $\alpha$ V $\beta$ 8 の発現を上昇させ、血管内皮細胞と細胞外基質との接着を亢進させることで管腔形成を誘導することを明らかにした。以上の結果より、IL-33 単独では管腔形成に関与していなかったが、ヒスタミンや TNF- $\alpha$  誘導管腔形成を増幅したり、MMP やインテグリンとの関与が考えられ、今後の課題である。また、HRG が TNF- $\alpha$  誘導管腔形成を Keap1-Nrf2 シグナルを介して抑制することを明らかにしたため、HRG は TNF- $\alpha$  シグナルを介した IL-33 関連血管新生に関与するかもしれない。

### HRG やフコイダンの 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。昨年度以前には、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、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。

糖尿病網膜症患者ではアンチトロンビン III(ATIII)が有意に低下していたことより、HRG 類似の活性が ATIII にも存在する可能性が示唆されたため、昨年度は、ATIII による好中球活性鎮静化効果についても調査を行った。その結果、HRG と同様の好中球正球化作用、活性酸素抑制作用、食能亢進作用を認めたため、ATIII は Anti-DAMPs の一種である可能性を示した。

## 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。昨年度以前には、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。昨年度は、免疫染色法により、モデルマウスの各種臓器 HRG の検出を試みたが、条件設定が良くなかったのか、検出できなかった。

### 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、HRG がどの HRG レセプターを介して作用を及ぼしているか siRNA を用いて検証する。また、2 価鉄による小胞体ストレス応答のより詳細なシグナル伝達経路を各種インヒビターを用いることで明らかにする。PolyP 研究に関しては、血管透過性亢進にどの分子が関係しているかを探索する。IL-33 の研究では、TNF- $\alpha$  と管腔形成に関するデータより、インテグリンとの関連性を確認する。また、ヒスタミンと管腔形成のデータより、MMP との関連性も確認する。AGE に関しては、新たな Anti-DAMP である ATIII との関係性を明らかにする。自由運動マウス実験においては、組織内 HRG の検出が難しく難航しており、HRG の組織内検出法の確立のための研究を進めている。上記の様に DAMPs/PAMPs が関与する病態は敗血症、播種性血管内凝固症候群、急性呼吸窮迫症候群、急性腎障害、脳梗塞などの急性病態だけでなく、動脈硬化、糖尿病、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、がんなどの慢性病態と多岐にわたる。DAMPs/PAMPs の細胞に対する作用機序を明らかにすることは、これら病態の理解を深め、新たな治療法の開発につながる。また、Anti-DAMPs/PAMPs である HRG はこれらの病態に対して有効な治療薬となりうる。今後も、これら多くの病態疾患の治療法をいち早く確立できるように研究を進めていく。

### 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)
Journal of pharmacological sciences	雑誌	2023 年 2 月 24 日
Archives of biochemistry and biophysics	雑誌	2023 年 10 月 31 日
日本薬理学会	口頭、ポスター	2023 年 10 月 31 日~ 11 月 1 日
日本生化学会	ポスター	2023 年 12 月 14~16 日