

2017年12月11日

## Damps 遮断に基づいた組織リモデリング病態の新規制御法の創成

代表研究者 就実大学薬学部 教授 森 秀治  
共同研究者 就実大学薬学部 講師 豊村隆男  
就実大学薬学部 助教 渡邊政博

### 【まとめ】

炎症の遷延化に基づく組織リモデリング病態の形成に関わる Damps を見出すために、タンパク質アレイ解析を実施し、HMGB1 結合因子として TWEAK を見出した。TWEAK は、血管内皮細胞の IL-8 産生を増大させた。また、AGE は特異的に TWEAK と結合し、これによって TWEAK 誘導性 IL-8 産生応答は抑制された。本知見から、組織リモデリング病態の制御のために TWEAK や AGE が重要な創薬標的となり得る事が示唆された。

### 1. 研究の目的

炎症の慢性化・遷延化は、細胞や組織の不可逆的な損傷や機能不全を引き起こし、様々な難治性疾患に共通した分子基盤である「組織リモデリング病態」の形成に重要な意義を担っている。しかしながら、組織リモデリング病態に対する有効な治療法は未確立のままであり、超高齢化社会を迎えた我が国の医療が取り組むべき喫緊の課題であると考えられている。

我々は、組織リモデリング病態の増悪期に、炎症性サイトカイン様活性を持った因子 (Damps) が損傷細胞自身から放出され、これらが病巣の増悪化に深く関与している事を明らかにしてきた。この知見は、Damps を制

御する事が、組織リモデリング病態の未然防止や根治的治療法を開発するにあたって、極めて有望である事を示唆するものであった。

これらの背景のもと、本研究では Damps 遮断薬に基づいた組織リモデリング病態の新規制御法の創成を目指して、創薬標的となる因子の探索と病態生理学的な機能制御研究を行った。実際には、代表的 Damps である HMGB1 を特異的プローブに用いたタンパク質アレイ解析による起炎症性機能分子複合体 (炎症性機能クラスター) を構成する因子の網羅的探索、構成因子の病態生理学的な機能探索、特にサイトカイン様活性の有無、組織リモデリング病態の重要な形成因子とされる AGEs (終末糖化産物) との相互作用などについて検討を行った。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 Damps シグナルに影響を与える生体因子の網羅的探索

HMGB1 (high mobility group box 1) は、炎症時に細胞から放出され、マクロファージ等の細胞表面上に存在するパターン認識受容体 (例えば、Toll 様受容体 (TLRs) など) を刺激して細胞を活性化し、炎症性サイトカインや活性酸素の産生亢進を通じて炎症や組織リモデリング病態の形成に働く代表的な

Damps 分子である。しかしながら、現時点で HMGB1 のような Damps 分子が病態局所において単独で存在するのか、あるいは他の生体因子と共に複合体を形成し得るのかについては、全く不明であった。仮に、HMGB1 に結合する因子が存在するならば、その結合因子は Damps である HMGB1 の生理活性に何らかの影響を及ぼす可能性を有する事が考えられた。本研究では、はじめに代表的 Damps である HMGB1 をプローブに用いて、タンパク質アレイを実施する事により Damps 機能に影響を与える因子の網羅的探索を行った。実際には、約 11,600 個のヒト組換えタンパク質がスポットされたアレイに、特異的的一次プローブ(ビオチン標識 HMGB1)を反応させ、洗浄後に二次プローブ(蛍光ストレプトアビジン)を反応させ、洗浄、乾燥の後に、各スポットの蛍光強度を測定し、HMGB1 に対する相互作用の有無を見積もった。得られた蛍光値のうち、Z-ファクター値をソートし、標準タンパク質(BSA)よりも高い蛍光シグナルを与えるものを結合因子候補として選別した。

## 2-2 HMGB1 結合因子の生理活性と病態生理学的意義の解明

上記のタンパク質アレイで見出された生体因子の免疫・炎症学的活性について検討した。実際には、血管内皮細胞株(EA.hy.926細胞)の炎症性サイトカイン(IL-8)発現応答に及ぼす影響、IL-8 発現応答に及ぼす AGE 共存の影響について検討を加えた。

## 2-3 プルダウンアッセイを用いた HMGB1 結合因子と AGE の相互作用

上記のタンパク質アレイで見出された生体因子の組換え体(ヒスタグ付加体)を作製し、

これをニッケルカラムに担持させ、AGE と反応させ、洗浄後にカラムに結合した画分を SDS-PAGE ゲル電気泳動で分析する事によって AGE との相互作用を検討した。

## 3. 研究の成果

### 3-1 Damps シグナルに影響を与える生体因子の網羅的探索

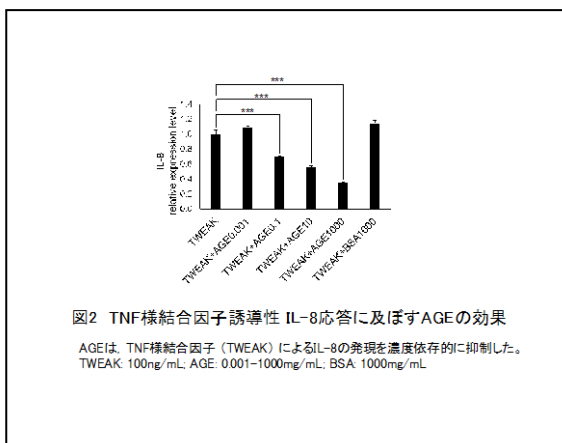
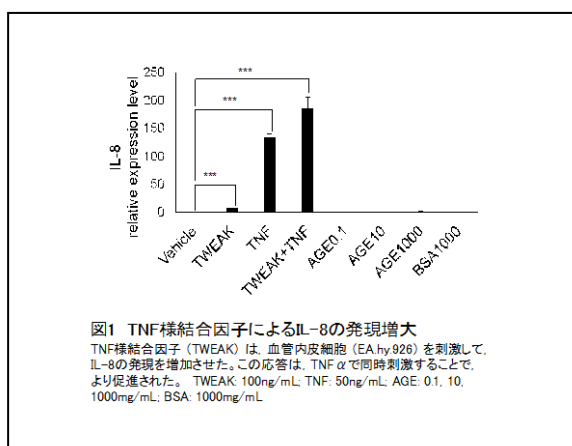
組織リモデリング病態の進行プロセスの中で、代表的 Damps 分子である HMGB1 と相互作用し得る生体因子の存在については、現時点で全く不明であった。本研究では、HMGB1 の病態生理をより明確にする目的で、HMGB1 のビオチン標識体を調製し、これをプローブに用いて HMGB1 結合因子探索のためのアレイ解析を行った。タンパク質アレイによる網羅的探索の結果、ニトロセルロースで被覆したスライドガラス上にスポットした約 116,000 種のタンパク質のうち、HMGB1 と高親和性で結合する因子が存在する事が明らかとなり、その一つが TNF(腫瘍壊死因子)スーパーファミリーに属する TWEAK であった。

本知見から、HMGB1 による炎症増悪化の過程で HMGB1 が TWEAK 等の生体因子と結合する事によって機能的複合体を形成している可能性が示唆された。

### 3-2 HMGB1 結合因子の生理活性と病態生理学的意義の解明

上記のタンパク質アレイ解析によって見出した TWEAK の免疫・炎症学的活性について血管内皮細胞株を用いて検討を行った。その結果、TWEAK は血管内皮細胞株の IL-8 mRNA 発現を有意に増大させる事が明らかとなった(図 1)。

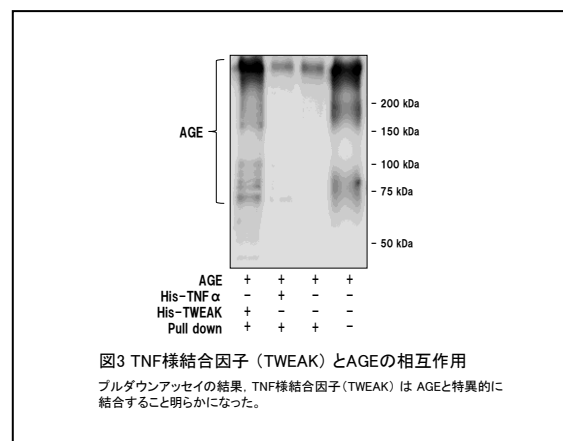
また, AGE は HMGB1 と同様に細胞のパターン認識受容体を刺激する事によって炎症病態の形成に関与する因子であるが, TWEAK の IL-8 mRNA 発現応答に AGE を共存させると, AGE は濃度依存的に TWEAK の効果を減弱させる事が示された (図 2)。



### 3-3 プルダウンアッセイを用いた HMGB1 結合因子と AGE の相互作用

プルダウンアッセイを駆使して, TWEAK と AGE の相互作用について検討を加えた。その結果, AGE は TWEAK と特異的に結合する事が明らかとなった。その一方で, TWEAK に類似した一次配列を持ち TNF スーパーフ

ァミリーに属する TNF $\alpha$ については AGE との結合性を全く示さない事から, TWEAK と AGE の特異的結合性が明らかとなった (図 3)。



これらの知見から, Damps による組織リモデリング病態の形成過程, 即ち炎症病態の増悪化の過程で, HMGB1 をはじめとする Damp 分子が TWEAK 等の他の生理活性因子と結合する事によって起炎性の機能分子複合体 (いわゆる, 炎症性機能クラスター) を形成している可能性が示唆された。また, 結合によって免疫・炎症活性の変化が認められる事から, 組織リモデリング病態の新たな制御法を創成していく上で, TWEAK や AGE が重要な創薬標的となり得る可能性が示唆された。

### 4. 今後の課題

本研究では, 組織リモデリング病態の形成に深く関与する Damps の代表格である HMGB1 に焦点をあて, タンパク質アレイ解析によって HMGB1 結合因子として TWEAK を見出した。加えて, TWEAK が AGEs と特異的に結合性を示す事や TWEAK の持つ免疫応答活性 (IL-8 mRNA 発現応答増大活性) が

AGE との結合によって抑えられる事も明らかとなった。今後は、これらの知見に基づいて、HMGB1 結合性あるいは AGE 結合性を担う TWEAK 中の最小配列を明らかにし、この一次配列を基にして、HMGB1 や AGE の生理活性を変化させる低分子タイプの分子標的薬の創成研究を展開し、Damps 遮断の原理に基づいた組織リモデリング病態の克服へと繋げて行く予定である。

#### 5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた成果は、次の英文専門誌

に原著論文として発表した。

Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S : Advanced glycation end products attenuate the function of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response.

Mol Cell Biochem

doi: 10.1007/s11010-017-3045-6. (2017)