

# 論 文 要 旨

## Nucleophosmin may act as an alarmin: implications for severe sepsis

ヌクレオフォスミンは重症敗血症時に  
アラミンとしてはたらく可能性がある

名和 由布子

### 【序論および目的】

侵襲に対して生体はヒエラルキーを持った応答をする。細胞レベルでは、*non-genomic reaction* (放出反応、プロスタグランジン産生放出など) から、*genomic reaction* (NF- $\kappa$ B, AP-1 活性化など) を介した新たな蛋白の合成などである。さらに侵襲が強いと、細胞は壊死に陥るが、最近、壊死細胞からも細胞生理活性をもったメディエーターが放出されて、侵襲に対し応答することが判明してきた。このうち、核タンパクである High Mobility Group Box-1 protein (HMGB1) は、ほとんどの壊死細胞、あるいは活性化マクロファージ、樹状細胞などから細胞外に放出され、敗血症性ショックの際のメディエーターとして作用することが判明し、いわゆる個体死のメディエーター (lethal mediator) として注目されている。このように、生体侵襲時に障害組織・細胞から放出され、自然免疫や炎症を誘導し、生体防御、そして修復に働く因子は”alarmin” とよばれている。HMGB1 以外には尿酸や heat shock proteins, S100 proteins などが alarmin としてあげられている。

我々は、HMGB1 以外の核由来の第2の alarmin の存在を想定して研究し、核タンパクの一つであるヌクレオフォスミン(NPM)が alarmin としての特徴を有するかどうかを検討した。

### 【材料および方法】

#### *In vitro*

1. LPS 刺激による NPM の細胞外への放出: マウスマクロファージ系の RAW264.7 細胞を LPS で刺激し、その上清中への NPM の放出を Western blotting (WB) で検討した。また、免疫染色および W.B. により、NPM の核、細胞質の分布を解析した。
2. 壊死細胞からの NPM の放出: RAW264.7 細胞を凍結融解の繰り返しにより壊死に陥らせ、細胞外の NPM を W.B. で検討した。
3. NPM の細胞生理活性:
  - 1) RAW 267.4 細胞を遺伝子組換え NPM (rNPM) で刺激して、細胞上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 を ELISA

で測定した。また、そのシグナル伝達経路についても WB および ELISA で検討した。

2) ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞 (HUVECs) を NPM で刺激し、細胞接着因子である ICAM-1 の発現を免疫染色および flowcytometry で調べた。

### *In vivo*

SD ラットを用い、盲腸結紮穿孔による実験的敗血症モデルを作成し、肺を免疫組織化学的に解析し、肺胞マクロファージにおける NPM の局在を調べた。また、腹水中の NPM の検出を WB で試みた。

## 【結果】

### 1. LPS 刺激による NPM の細胞外放出

RAW264.7 細胞を用いた培養細胞系の実験では、LPS 刺激により NPM は核から細胞質へ移動し細胞外に放出されること、壊死細胞からも細胞外へ放出されることが観察された。

### 2. NPM の細胞生理活性

培養細胞に rNPM を加えて刺激すると RAW264.7 細胞から TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 の産生が誘導された。この反応は MAPK を介することが考えられ、ERK1/2 の阻害剤である U0126 で TNF- $\alpha$ 産生が抑制された。

HUVECs では rNPM により ICAM-1 の発現が亢進した。

### 3. 敗血症モデルラットにおける NPM の動態

対照ラットの肺胞マクロファージ細胞質には NPM を認めなかったが、実験的敗血症モデルラットの肺胞内マクロファージ細胞質には NPM が認められた。また、実験的敗血症モデルラットの腹水中にも NPM を検出できた。

## 【結論及び考察】

核タンパクの一つである NPM は HMGB1 と同様、LPS 刺激あるいは壊死にともない、核から細胞質、さらに細胞外に放出されること、そしてマクロファージ系の RAW264.7 細胞において、炎症性サイトカインの産生誘導という細胞生理活性を発揮することが検証された。個体においても、敗血症モデルラットにおいて、肺胞マクロファージの NPM の核外への移行を認め、腹水中にも NPM が確認された。このように核タンパクの一つである NPM も HMGB1 と同様に敗血症時に細胞外に放出され、全身性炎症のメディエーターとして振る舞うことが示唆された。すなわち NPM は “alarmin” の一つである可能性が示唆された。今後、さらに NPM の受容体の同定とそのシグナル伝達、敗血症患者の血清中での NPM ダイナミクス の解明などの課題を克服して、敗血症の新たな治療標的としての NPM を検証してゆきたい。

# 論文審査の要旨

報告番号	総研第 72 号		学位申請者	名和 由布子
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位	博士 (医学)
	副査	金蔵 拓郎	副査	上村 裕一
	副査	久保田龍二	副査	堀内 正久

## Nucleophosmin may act as an alarmin: implications for severe sepsis

(ヌクレオフォスミンは重症敗血症時にアラミンとしてはたらく可能性がある)

生体侵襲時に、障害組織・細胞から放出され、自然免疫や炎症を誘導し、生体防御・修復に働く生体内因子は"alarmin"と呼ばれている。例えば、核タンパクである High Mobility Group Box-1(HMGB-1)は、壊死細胞、活性化マクロファージや樹状細胞などから細胞外に放出され、敗血症性ショックのメディエーターとして作用し、個体死のメディエーター (lethal mediator)として注目されている。申請者は、HMGB-1 以外の他の核由来 alarmin を想定し、核タンパクの一つであるヌクレオフォスミン(nucleophosmin: NPM)が alarmin としての特徴を有するかについて検討した。

### 【材料と方法】

- in vitro* の実験：マウスマクロファージ系の RAW264.7 細胞を lipopolysaccharide (LPS)で刺激し、培養液中への NPM 放出を western blotting (WB)で検討した。免疫染色や WB で NPM の細胞内局在を解析した。また、RAW264.7 細胞を凍結融解で壊死させ、細胞外への NPM 放出を検討した。さらに、NPM の細胞生理活性を調べる為、RAW264.7 細胞を遺伝子組換え NPM (rNPM)で刺激し、培養液中の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6)、macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定した。ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVECs)を rNPM で刺激し、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を免疫染色と flowcytometry で調べた。
- in vivo* の実験：Sprague-Dawley ラットを用い、盲腸結紮穿刺(CLP)で敗血症ラットを作成し、肺を免疫組織学的に検索し、マクロファージの浸潤および NPM の細胞内局在を調べた。また、敗血症ラット腹水中の NPM を検索した。

### 【結果】

- RAW264.7 細胞を LPS で刺激すると、NPM は核から細胞質へ移動し、さらに細胞外へ放出された。
- RAW264.7 細胞を rNPM で刺激すると、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 の産生が誘導された。extracellular-regulated kinase-1/2 (ERK1/2)阻害剤で TNF- $\alpha$ の産生は抑制された。また、HUVECs を rNPM で刺激すると ICAM-1 の発現が上昇した。
- 実験的敗血症ラットの肺胞マクロファージでは、細胞質にも NPM が局在し、腹水中にも NPM が検出された。

### 【考察】

核タンパクである NPM は、壊死に伴い核から細胞質に移行し、細胞外へ放出され、RAW264.7 細胞に炎症性サイトカインの発現増強を誘導した。NPM は、敗血症モデルラットで肺胞マクロファージの細胞質分布および腹水への放出が確認され、全身性メディエーターとして振る舞い、alarmin の一つである可能性が示唆された。

この研究は、核タンパク NPM の alarmin としての側面を明らかにし、今後の NPM を指標とした敗血症の診断や治療の可能性を示唆した興味深いものである。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 72 号		学位申請者	名和 由布子
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	金蔵 拓郎	副査	上村 裕一
	副査	久保田龍二	副査	堀内 正久

主査および副査の5名は、平成21年8月24日、学位申請者 名和由布子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Nucleophosmin (NPM)を western blotting (WB)で検出するのにヘパリンセファロースを用いているが、濃縮しているのか。

(回答) NPM は結果的に濃縮されている。

質問2) NPM を ELISA で測定することは可能か。

(回答) ELISA による NPM の測定はまだ確立されていない。

質問3) 腹水に NPM が検出できて血中には検出できないことの意味はどの様に考えているか。また、ヒトの腹水に NPM が検出されていると論文にあるが、血中では検出はできたのか。

(回答) 血中で検出できないのは実験手技的な問題や血中での分解の可能性が考えられる。後日の実験によりヒトの血漿でも NPM を検出したが、症例数が少なく結果が不安定であるため、現時点では確実とはいえない。

質問4) NPM は血中で検出されないということであるが、局所でのみ alarmin として作用しているのか、検出感度が上がれば全身性に alarmin として作用すると考えているのか。

(回答) 今回の結果から NPM は局所での alarmin の作用があり、全身性に作用している可能性もあると考えている。

質問5) recombinant NPM (rNPM)の精製は難しいのか。

(回答) リコンビナント製剤としての精製の困難さはわからないが、lipopolysaccharide (LPS)の混入があるため除去が必要である。他のリコンビナント製剤でも LPS が混入していることがあるため注意が必要である。

質問6) NPM はヘパリン結合タンパクだが、ヘパリンを治療に使っている場合、測定は不可能なのではないか。

(回答) ヘパリンを使用する場合は測定に影響を及ぼすと思われる。敗血症およびそれに起因する播種性血管内凝固症候群に対するヘパリン投与は否定的意見が多く、NPM 除去目的にヘパリンを投与することは考えていない。

質問7) 論文中で NPM は虚血モデルで細胞保護作用があるということだが、抗虚血効果があるということか。

(回答) 虚血モデルで細胞内に増加しアポトーシスを抑制しているという文献があり、保護作用はあると思われる。

質問8) NPM はリン酸化によって作用が変わるのか。細胞外の NPM は脱リン酸化しているのか。

(回答) NPM は 12 箇所ほどリン酸化される部位をもっており、リン酸化されることで核から細胞質へ移動する。細胞外の NPM の脱リン酸化については検討していない。

質問9) 抗体のエピトープおよび PI value の情報をもっているか。

(回答) 抗体のエピトープおよび PI value は確認していない。

質問10) rNPM の熱処理はどのような設定で行ったのか。

(回答) 100℃ 20分で行った。

質問11) Figure 1D で行っている freeze and thaw は細胞の壊死モデルとして認められているか。

(回答) いくつかの文献より、非感染性壊死モデルとして用いられているのを確認している。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 2) Figure 1 の WB では、各レーンのタンパク量は何を基準に決めたのか。

(回答) Figure 1B の培養上清は同じ量の上清中のタンパクである。Figure 1D では同数の細胞遠心上清のため freeze and thaw をしたものとコントロールとでは細胞の壊れ方が違うので、各レーンのタンパク量が異なる。

質問 1 3) LPS と rNPM の刺激実験に同じマクロファージ系の細胞を用いているが、生体において、近くに存在するマクロファージに影響を及ぼすことを想定しているのか。

(回答) 細胞外に放出された NPM が放出した細胞そのものまたは近くの細胞に作用することを想定している。

質問 1 4) 敗血症における alarmin は生体にとって悪いもので、この制御により治療に使えるのか。

(回答) 代表的な alarmin である high mobility group box 1 (HMGB1) は局所的では修復に働き、血流にのって全身を循環すると致死因子となることが報告されており、抗体やアンタゴニスト、カラム吸着などによる制御により治療に使用しようとする動きがある。

質問 1 5) Alarmin がアポトーシス細胞から出ないのはなぜか。能動的に出ることに意味があるのか。

(回答) アポトーシスという細胞死では細胞内のタンパクは放出されないため、alarmin の定義からはずれる。刺激により能動的に細胞外に出たタンパクが様々な作用をもつことがわかり、細胞死が無駄にならないという考え方になっている。

質問 1 6) LPS や rNPM で細胞を刺激する実験で刺激 2 時間前に starvation するのはなぜか。

(回答) 培養液中の増殖因子、アルブミンなどの影響を除くために通常この手順で刺激実験を行っている。

質問 1 7) NPM の局在、細胞外放出に対するタイムコースを検討したか。

(回答) LPS 刺激では刺激後 12 時間後から培養上清中に NPM が検出される。核から細胞質への NPM の移動は 6 時間と 16 時間後を比較し、figure 2 で示したように 6 時間で細胞質の局在を認めたが、より細かいタイムコースでの検討はしていない。

質問 1 8) mitogen-activated kinases (MAPKs) 以外の経路、他のサイトカインは検討したか。

(回答) 今回は受容体がわからないため、その経路として可能性の高い MAPKs を検討し、それ以外の経路は件としていない。TNF- $\alpha$  以外のサイトカインは IL-6 を検討したが有意な結果は得られなかった。

質問 1 9) NPM の受容体は検討したのか。検討したのであればどんな実験をしたのか。

(回答) Toll like receptor (TLR) -2, 4 について、RAW264.7 細胞に rNPM と各抗体を加え、サイトカイン産生を測定したが、有意な結果は得られていない。receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) の可能性も考えている。

質問 2 0) 敗血症と血液腫瘍以外に NPM が alarmin として病態に関与していると考えられる疾患はあるか。

(回答) 固形腫瘍でも例えば肝臓癌では過剰発現していることが報告されており、増殖活性と関連がある。

質問 2 1) Figure 5 で human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) における intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を検討しているが、マクロファージ上での発現は検討したか。

(回答) マクロファージでは今回は検討していない。

質問 2 2) HMGB1 に対するトロンボモジュリンのように NPM を局所にとどめ全身化を防ぐ機構はあるか。

(回答) 文献によると細胞表面のシンデカン、ヘパラン硫酸との結合の可能性はある。

質問 2 3) NPM の mutation は embryonic lethality をきたすがその機序はどのようなものか。

(回答) NPM は中心体の複製に必要で、細胞周期を調節するため、NPM をロックアウトすると細胞分裂が正常にできない。文献によると NPM は前脳および造血器の発生に必要とされている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。