

論文要旨

CRP induces High Mobility Group Box-1 Protein Release through activation of p38MAPK in macrophage cell line RAW264.7 cells

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞において
CRP 刺激は p38MAPK を介して HMGB1 を放出する

川原 幸一

【序論および目的】

C 反応性タンパク質 (CRP) は、広範囲に使用されている炎症マーカーである。その CRP が炎症を惹起するという報告が増えている。最近、核内タンパク質である High Mobility Group Box 1 (HMGB1) がネクロシス細胞、そして TNF- α 等の炎症性サイトカインにより刺激された単球/マクロファージ細胞から細胞外へ放出されることが証明された。一度、細胞外へ放出された HMGB1 は、強力な炎症のメディエーターとして働き、非常に注目されている。従って、本研究の目的は、炎症マーカーの CRP が新規炎症性メディエーターの HMGB1 放出を惹起するか、そして、その放出経路の解明を目的に本研究を行った。

【方法】

HMGB1 の検出; HMGB1 ELISA kit、ウエスタンブロット法 (WB 法) **CRP の精製**; 粗 CRP を Amicon Ultra-4 を用い精製した。(エンドトキシンが 5pg/ml 以下) **CRP の刺激実験(濃度依存)**; CRP を最終濃度 0~80 μ g/ml になるように RAW264.7 細胞に添加した。**CRP の刺激実験(時間依存)**; CRP と RAW264.7 細胞のインキュベーション時間を 0~24 時間にした。さらに TNF- α の検出を ELISA 法にて検出した。**Cell viability**; Annexin-V、MTT 試薬を用いて CRP 添加後の細胞の生存をフローサイトメーター (FACS)、マイクロプレートリーダーを用い検出した。**蛍光免疫染色**; 4 ウェルスライドに播種した RAW264.7 細胞に CRP を添加した。細胞をホルマリンで固定し、ブロッキング試薬を添加する。一次抗体に抗 HMGB1 抗体、nonimmune IgG を用いた。**CRP 結合実験**; CRP を RAW264.7 細胞に添加し、2 時間培養した。細胞を回収後、抗 CRP 抗体、nonimmune mouse IgG を用い CRP の結合を FACS を用い検出した。**CRP 競合実験**; CRP を添加する前に、イムノグロブリン (Ig) の Fc 部分、Fab 部分を添加する。その後、CRP を添加し、Ig の Fc、Fab との競合を FACS 法で検出した。**MAPKs assay**; CRP を RAW264.7 細胞に 0~24 時間培養した。回収した細胞に SDS 溶解液を添加し、電気泳動を行った。抗 phospho-ERK, JNK, p38MAPK 抗体を添加した。ECL システムにて MAPKs の活性化の検出を行った。**抑制実験**; CRP を刺激前に、SB203580, U-0126, p38MAPKsiRNA を添加し抑制効果を検討した。

【結果および考察】

1. CRP 特異的に HMGB1 放出を惹起する。

CRP の精製を行った結果、銀染色、WB 法にてシングルバンドを確認した。アミコンカラムの素通り画分の Passed solution (P) 1, P2, 精製 CRP、熱処理した P1,そして精製 CRP を RAW264.細胞に添加し、HMGB1 の放出を検討した。精製 CRP, P1, 熱処理した P1 が HMGB1 放出を惹起した。以上の結果より、P1 分画は、熱処理したにも関わらず HMGB1 放出がみられ、非タンパク性の因子(LPS、NaN₃ 等)が含まれていることが示唆された。しかしながら、P2 分画は、HMGB1 放出を惹起出来なかったため、非タンパク性因子が除去されたと考えられる。精製 CRP は、HMGB1 の放出を惹起させたが、熱処理した精製 CRP はコントロールと同程度であった。また、CRP は濃度依存的、時間依存的にそして CRP 特異的に HMGB1 放出を惹起させた。現在までに、HMGB1 放出には細胞障害による放出と炎症性サイトカインによる放出が知られている。そこで我々は、アネキシン-V, MTT 法を用いて、CRP による細胞障害を検討したがネクローシスなどの細胞障害は認められなかった。次に、CRP 添加による TNF- α の産生を ELISA 法で測定したところ TNF- α が 10ng/ml 産生された。この濃度の 5 倍量(50ng/ml) の TNF- α を添加しても、HMGB1 の放出は全く検出されなかった。これらの結果は、他の因子 (LPS, NaN₃, サイトカイン) に影響されることなく、CRP 自身が細胞に直接作用することにより HMGB1 の放出を惹起させることを示している。

2. CRP 刺激の HMGB1 放出は細胞の核からである。

CRP 添加後、細胞を固定し、HMGB1 の translocation を蛍光免疫染色法にて確認した。CRP 添加では HMGB1 が核から細胞質へ移行しているのが確認された。したがって、CRP による HMGB1 放出は、細胞核からの translocation であることが示唆された。

3. CRP は RAW264.7 細胞に Fc γ receptor を介して HMGB1 放出を惹起する。

CRP が細胞に直接結合することを FACS により示した。CRP は、Fc γ receptor と結合することが知られている。そこで競合実験(Fc 部分, Fab 部分との競合)の結果、Fc 部分のみが CRP と細胞との結合を 65%抑制した。さらに、Fc 部分が HMGB1 放出を惹起するかを検討した。Fab 部分は HMGB1 放出を惹起せず、CRP, Fc 部分が HMGB1 放出を惹起した。従って、CRP は、細胞の Fc γ receptor を介して直接結合することが示唆された。

4. CRP による HMGB1 放出は p38MAPK を介している。

CRP は、ERK1/2 と p38MAPK を活性化した。それぞれの阻害剤(U-126, SB203580)を使い、HMGB1 放出抑制を調べた。p38MAPK の阻害剤 SB203580 のみが HMGB1 の放出を抑制した。さらに p38MAPK の siRNA により p38MAPK をノックダウンされた RAW264.7 細胞では control siRNA と比較して CRP による HMGB1 放出が抑制された。これらの結果より、CRP による HMGB1 放出は p38MAPK を介していることが強く示唆された。

【結論】

動脈硬化症を含む炎症のマーカーである CRP が Fc γ receptor/p38MAPK を介して HMGB1 放出を惹起することを初めて報告した。CRP が単なる炎症のマーカーだけでなく、動脈硬化症を含む、炎症の誘導、増幅、進展に重要であることが示唆された。

(Cardiovascular Pathology 2007 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1447 号	氏名	川原 幸一
審査委員	主査	金蔵 拓郎	
	副査	榮鶴 義人	乾 明夫

CRP induces High Mobility Group Box-1 Protein Release through activation of p38MAPK in macrophage cell line RAW264.7 cells

(マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞において CRP 刺激は p38MAPK を介して HMGB1 を放出する)

C 反応性タンパク質 (CRP) は、炎症マーカーとして広範囲に使用されている。その CRP が炎症を惹起するという報告が増えている。最近、核内タンパク質である High Mobility Group Box 1(HMGB1)が壊死細胞から、あるいは、TNF- α 等の炎症性サイトカインで刺激された単球/マクロファージ細胞から細胞外へ放出されることが証明されている。一旦、細胞外へ放出された HMGB1 は、強力な炎症のメディエーターとして働く。申請者らは、炎症マーカーの CRP が新規炎症性メディエーターの HMGB1 放出を惹起するのか、さらには、その放出経路の解明を目的に本研究を行った。

本研究では、マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞 (RAW264.7 細胞) を用いて、CRP が RAW264.7 細胞に直接結合して HMGB1 を放出するのかを検討すると共に、この放出機構が細胞死による放出(passive pathway)か、もしくは、CRP による細胞の活性化による放出(active pathway) について検討した。更に、CRP の刺激により細胞内の mitogen activated kinase (MAPKs)のリン酸化をコントロールと比較検討した。

本研究で得られた新知見は次の 3 点である。

- ① 精製した CRP の RAW264.7 細胞への添加実験において、CRP は、濃度および時間依存的に HMGB1 の細胞外放出を惹起した。CRP は、RAW264.7 細胞の Fc γ receptor に結合し、その放出機構は、細胞死を伴わない、また、他のサイトカイン (TNF- α) の影響を受けない active pathway である。
- ② CRP 刺激により RAW264.7 細胞から放出される HMGB1 は、核内 HMGB1 である。
- ③ CRP は ERK と p38MAPK を活性化した。それぞれの阻害剤 (U0126 [ERK inhibitor], SB203580 [p38MAPK inhibitor]), を用いたところ、SB203580 だけが HMGB1 の放出を抑制した。さらに、p38MAPK の特異的な siRNA を用いても同様の結果を得た。したがって、HMGB1 の放出機構は p38MAPK を介していた。

本研究では、動脈硬化症を含む炎症のマーカーである CRPFc γ receptor/p38MAPK を介して HMGB1 細胞外放出を惹起することが明らかにされた。CRP が単なる炎症のマーカーだけでなく、動脈硬化症を含む、炎症の誘導、増幅、進展に重要であることを証明し、急性炎症から慢性炎症の枢軸の解明ならびに新規治療法の開発につながる新しい視点を提供している。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。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1447 号	氏名	川原 幸一
審査委員	主査	金蔵 拓郎	
	副査	榮鶴 義人	乾 明夫
<p>主査および副査の3名は、平成19年11月1日、学位請求者 川原幸一君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、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。</p> <p>質問1) HMGB1の名前の由来は何か。 (回答) HMGB1蛋白質は非ヒストン核蛋白の主要成分として知られて、その名は電気泳動上の高度な移動性に由来する (HMG= high mobility group)。</p> <p>質問2) CRPとHMGB1との時間的な差はどのくらいか。 (回答) CRPは、24時間から48時間から検出され、HMGB1は、3日から4日目より検出される。</p> <p>質問3) Figure 1 Fのみ、CRPの最終濃度が20µg/mlから80µg/mlなのはなぜか。 (回答) CRP20µg量の溶媒よりもさらに4倍量を用いてもHMGB1を惹起させない(非タンパク性因子が除かれている)ことを証明するためである。</p> <p>質問4) 今回、TNF-αで刺激してHMGB1が出なかったのはなぜか。 (回答) 1999年、SIENCE誌のWangらによる報告はTNF-α刺激後48時間である。今回は刺激の時間が短かったからである。</p> <p>質問5) 疾患によってHMGB1の量に差はあるのか。 (回答) 敗血症と脳梗塞で報告がある。敗血症は80-100ng/ml、脳梗塞は50-100ng/mlである。健常人は0ng/mlである。</p> <p>質問6) HMGB1の血中での半減期はどのくらいか。 (回答) 私たちのデータからではHMGB1の半減期は18時間である。</p> <p>質問7) HMGB1に結合している物質はないか。 (回答) 今のところ報告はない。我々も現在探索中である。</p> <p>質問8) 生体内においてCRPからのHMGB1の放出期間はどのくらいか。 (回答) 今回の実験からではCRPとHMGB1の放出は、24時間までである。しかしながら生体内ではCRP以外のHMGB1惹起因子が存在するので具体的にはわからない。事実、ステロイドを使用してもCRPは減少するがHMGB1は血中に維持されているからである。</p> <p>質問9) サイトカイン以外でペプチド例えば、インスリンなどでHMGB1は放出されるか。 (回答) インスリンによりHMGB1が放出されるという報告はない。ペプチドではないがH₂O₂、NOで放出されるという報告がある。</p> <p>質問10) CRP-HMGB1の放出は炎症において大きな位置を占めているか。 (回答) 次の課題として、さらなる研究を行う予定である。</p> <p>質問11) HMGB1はエンテロサイトでは何をしているか。 (回答) 異物と直接接触しているので、HMGB1は、抗菌作用として働いている可能性がある。事実、BAL中にもHMGB1は存在し、抗菌作用を発揮していることが報告されている。</p> <p>質問12) Figure 1Dの20h, 20µg/mlのHMGB1濃度とFigure 1Eの20h, 20µg/mlのHMGB1濃度に解離があるのは何故か。 (回答) Figure 1D、Figure 1Eの実験の条件を同じにしているが、細胞数、細胞の状態が合わなかったと考えられる。</p>			

質問 13) TNF- α 以外のサイトカインでは HMGB1 は放出しないのか。

(回答) HMGB1 の放出を惹起させるサイトカインで代表的なものということで今回は TNF- α だけ行った。

質問 14) Figure 4A において、ERK は、6 時間からでもリン酸化されるのか。

(回答) 今回用いた RAW264.7 細胞においては、6 時間では ERK の活性化が起きた。おそらく、細胞の維持(生存)において RAW264.7 細胞は ERK の活性化が必要ではないかと考えられる。

質問 15) MAP キナーゼのリン酸化は 30 分から、CRP と RAW264.7 細胞の結合は 2 時間で確認され、HMGB1 の産生は 12 時間からみられる。本論文の主旨からしてタイムフレームに興味がある。実際の生体内では CRP による HMGB1 の産生刺激は炎症初期から始まっているのか。

(回答) in vitro の実験は static な系で、しかも CRP と RAW264.7 細胞と 1:1 の反応である。生体内の条件とはかなり解離している。従って、HMGB1 の放出は生体内と比較すると、かなり早い時間で放出されると考えられる。生体内における動態については、組織障害が起こってから約 24 時間から 48 時間後から CRP は検出され、その後、72 時間後から HMGB1 が検出される。

質問 16) 血管平滑筋細胞にも同様の反応 (CRP から HMGB1 を放出するか) がおきるのか。

更に他の細胞ではどうか。

(回答) 血管平滑筋細胞を用いて、CRP 刺激により HMGB1 が放出されることを報告しています。また、他の体細胞においてもこのような事象(急性から慢性)があると考えられる。というのは、Fc γ -receptor が発現している細胞が報告されているからである。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・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。