

学 位 論 文 の 要 約 (研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 森 秀 樹

学位論文名 表皮角化細胞における poly(I:C)誘導炎症に対する
Reduced-HMGB1 の抑制効果について

学位論文の要約

High Mobility Group Box 1 (以下 HMGB1) は、核内で DNA に結合する非ヒストンタンパクで、DNA の保持や転写に関与している。ところが、細胞壊死などにより細胞外へ排出されると、他のサイトカインや DNA などと結合し、マクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞に対して炎症誘導作用を持つことが知られている。また、HMGB1 は Toll 様受容体 (Toll like receptor : TLR) 2, 4, 9 などの自然免疫系の受容体のリガンドとしても知られており、これらを介して直接または間接的に炎症性サイトカイン産生に関与すると報告されている。一方で HMGB1 は細胞膜レセプターである RAGE を介して細胞遊走能を活性化する走化性因子としても知られており、創傷治癒において重要な役割を果たしていることが分かってきた。近年その 2 つの機能は、HMGB1 が有する 3 つのシステイン基の酸化還元反応による Redox status に依存することが明らかとなり、炎症誘導作用をもつ Disulfide-HMGB1、細胞遊走能をもつ Reduced-HMGB1、科学的な作用をもたない Oxidized-HMGB1 の 3 つが報告されている。

しかし、表皮角化細胞に対する細胞外 HMGB1 の直接的な働きについてはいまだ報告がない。そこで我々は、ヒト表皮角化細胞に対する外因性の HMGB1 の影響を調べた。

方法) 1、ヒト単層培養角化細胞に対して直接 disulfide-HMGB1 および reduced-HMGB1 を作用させて、各種サイトカインの mRNA を調べた。2、TLR3 のリガンドである poly(I:C)を用いて角化細胞に炎症性サイトカインを誘導し、その炎症に対するそれぞれの HMGB1 の効果を調べた。

炎症性サイトカインは IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 、IFN- β を対象とし、mRNA は qRT-PCR 法で計測し、培養液中のタンパク質の測定には ELISA 法を用いた。また細胞内シグナルのリン酸化の測定には Western blot 法を用い、免疫蛍光染色法、免疫沈降反応法、Flow cytometry 法などを用いて poly(I:C)および HMGB1 の細胞内および核内への取り込みを調べた。

結果) Disulfide-HMGB1 は表皮角化細胞に対して炎症性サイトカインの mRNA を誘導するが、単独ではタンパク産生までは至らなかった。しかし、poly(I:C)との同時投与で poly(I:C)による炎症反応を増強することがわかった。一方で Reduced-HMGB1 は炎症性サイトカインの mRNA および

タンパクは誘導しなかったが、poly(I:C)刺激の直前に投与すると炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。そこで、poly(I:C)のレセプターである TLR3、RIG-I、MDA5 と、その後の細胞内シグナルである、MAPK 経路、NF- κ B 経路、IRF3 経路について調べたところ、レセプターと MAPK 経路は抑制されていなかったが、NF- κ B 経路および IRF3 経路が抑制されていることが分かった。

次に reduced-HMGB1 の作用機序について、細胞膜のレセプターを介するものなのか、細胞内への取り込み阻害なのかについて調べた。ま HMRG1 レセプターである TLR2、9(角化細胞は通常状態では TLR4 は発現していない) および RAGE の mRNA を調べたところ、いずれのレセプターも関連性がみられなかった。そこで poly(I:C)および HMGB1 またはその複合体の細胞内の取り込みを調べるため、免疫沈降反応法を用いて poly(I:C)と HMGB1 を反応させたところ、disulfide-HMGB1 は poly(I:C)と結合するが、reduced-HMGB1 は結合しないことが明らかとなった。さらに FITC でラベルした poly(I:C)の細胞内への取り込みを免疫蛍光染色および Flow cytometry 法で確認したところ、reduced-HMGB1 投与群で poly(I:C)の細胞内への取り込みが抑制されていることがわかった[Mori et al, 2018:]。

結論) 以上のことから、表皮角化細胞においては reduced-HMGB1 が poly(I:C)の細胞内への取り込みを抑制することで、炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなったが、そのメカニズムの詳細はいまだ不明であり、今後の研究課題である。しかし、現在までに HMGB1 の直接的な抗炎症作用について述べた報告はなく、今回我々が初めて見出した新しい事実である。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Mori M, Murakami M, Tsuda T, Kameda K, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Nakaoka H, Sayama K : Reduced-HMGB1 suppresses poly(I:C)-induced inflammation in keratinocyte. *Journal of Dermatological Science* 2018
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.01.007