

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- κ 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- α 、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- α , 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- α 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。