

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19196

研究課題名(和文) 臨床検査への応用を目的とした樹状細胞のミトコンドリア活性測定法の開発

研究課題名(英文) Development of new method for measuring mitochondrial activity of dendritic cells

研究代表者

後藤 和人 (Gotoh, Kazuhito)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50711214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： p32遺伝子の細胞特異的欠損マウスを樹立した。マウスより樹立した線維芽細胞やマクロファージを用いて、IL-6がミトコンドリア依存的に過剰に産生されることを見出した。また、その過剰にサイトカインが産生される原因遺伝子が、ATF4という分子であることを明らかにした。さらに、敗血症モデルを用いて、個体レベルにおける過剰なIL-6産生の分子メカニズムの一端も解明した。

本研究で予定していた樹状細胞のリアルタイムの代謝活性を測定するシステムを構築して、マウスの樹状細胞での解析を行った。申請者らは、p32遺伝子が樹状細胞においてミトコンドリアの代謝を制御するのみでなく、抗原提示も制御することを見出した。

研究成果の概要(英文)： Sepsis is a major cause of morbidity and mortality in seriously ill patients and mitochondrial dysfunction is associated with poor outcomes in septic patients. We identified p32/C1QBP/HABP1 as a regulator of IL-6 production in response to lipopolysaccharide (LPS). LPS induced IL-6 overproduction in p32 deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) through activating transcription factor (ATF) 4 dependent pathways. Using a LPS-induced endotoxin shock model, mice with p32 ablation in myeloid cells showed increased lethality and overproduction of IL-6. We constructed new system to measure real-time metabolic activity of dendritic cells. We demonstrated that p32/C1qbp, which functions as a multifunctional chaperone protein of mitochondria, supports not only mitochondrial metabolism but also DC maturation.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は1973年にRalph Steinmanらにより同定され、以後各国において精力的に研究が進められた。その結果、樹状細胞は、生体内ではごく少数であるにもかかわらず自然免疫・獲得免疫において司令塔として働くことが明らかとなった。さらに樹状細胞は病原体のみならず、宿主のがん細胞に対する免疫能も有することが指摘された。米国において2010年には前立腺癌に対する腫瘍抗原とGM-CSF融合たんぱく質で感作した自己樹状細胞ワクチン(Sipuleucel-T)がFDA承認された。国内においても、樹状細胞にがん細胞のペプチドを投与して行う免疫療法が先進医療や自由診療として行われており、大学や企業における免疫療法の研究開発は活性化している。

近年、ミトコンドリアと免疫細胞の関係は、国内外において注目を集めている。また、マウスの未熟な樹状細胞は、ミトコンドリア依存的なエネルギー産生により生存し、逆に抗原提示している成熟した樹状細胞は非ミトコンドリア的(解糖系依存的)なエネルギー産生が主体になっていることが報告された。さらに未熟な樹状細胞から成熟した樹状細胞になるためにはミトコンドリア依存的なクエン酸回路の増強が必須であることも示された。申請者らの独自の研究結果(投稿中)も踏まえて、未熟な樹状細胞の機能維持や樹状細胞の成熟化過程においてミトコンドリア機能が重要な役割を演じていると申請者は考えた。

2. 研究の目的

本研究は『臨床検査への応用を目的とした樹状細胞のミトコンドリア活性測定法の開発』を目標にして、マウス骨髄樹状細胞やヒト単球樹状細胞を用いて分子細胞生物学・臨床検査医学・実験病理学を融合したアプローチにより、ミトコンドリアと樹状細胞の関係を包括的に解析し、新規臨床検査を作出することを目的としている。このため、独自に作成したミトコンドリア機能不全樹状細胞やミトコンドリア活性を低下させる阻害剤を用いて、

- ① マウス骨髄樹状細胞とヒト単球樹状細胞におけるミトコンドリア機能を明らかにする。マイクロアレイやメタボローム解析などの網羅的解析を行い(分子細胞生物学的アプローチ)、ミトコンドリアに関連する重要な遺伝子や代謝産物を網羅的に同定する。
- ② マウス骨髄樹状細胞とヒト単球樹状細胞を用いて、少数の細胞でも可能なミトコンドリア活性測定法を検討する(臨床検査医学的アプローチ)。
- ③ 実際のマウスモデルにおいて、マウス骨髄樹状細胞の腫瘍免疫におけるミトコンドリア機能を明らかにする(実験病理学的アプローチ)。

最終的にこれらの結果を融合して、①ミト

コンドリアと樹状細胞の関係を包括的に解析して、②少数の樹状細胞で実現可能な臨床検査法を構築して、③実際の臨床に即しているのか検証する。

3. 研究の方法

本研究は『臨床検査への応用を目的とした樹状細胞のミトコンドリア活性測定法の開発』を目標にして、マウス骨髄樹状細胞やヒト単球樹状細胞を用いて分子細胞生物学・臨床検査医学・実験病理学を融合したアプローチにより、ミトコンドリアと樹状細胞の関係を包括的に解析することを目的としている。このため、以下のような計画・方法にて研究を進める。

- ① マイクロアレイやメタボローム解析などの網羅的解析を行い(分子細胞生物学的アプローチ)、重要な遺伝子や代謝産物を網羅的に同定する。
- ② マウス骨髄樹状細胞とヒト単球樹状細胞を用いて、少数の細胞でも可能なミトコンドリア活性測定法を検討する(臨床検査医学的アプローチ)。
- ③ 実際のマウスモデルにおいて、マウス骨髄樹状細胞の腫瘍免疫におけるミトコンドリア機能を明らかにする(実験病理学的アプローチ)。

4. 研究の結果

1. マウス骨髄樹状細胞のリアルタイムの代謝解析

独自に作成した p32 欠損樹状細胞(ミトコンドリア機能不全)は、ミトコンドリア呼吸障害・乳酸の蓄積など典型的なミトコンドリアの機能障害を認めた(投稿準備中)。

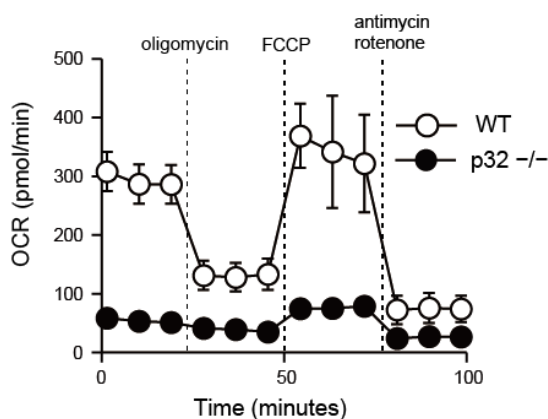


図1 樹状細胞の酸素消費量のリアルタイムの測定

2. マウス骨髄樹状細胞の代謝産物解析

マウス骨髄樹状細胞で代謝産物の解析を行った結果、150種類以上の中央代謝経路の代謝産物・50種類以上の脂質を測定可能であった。

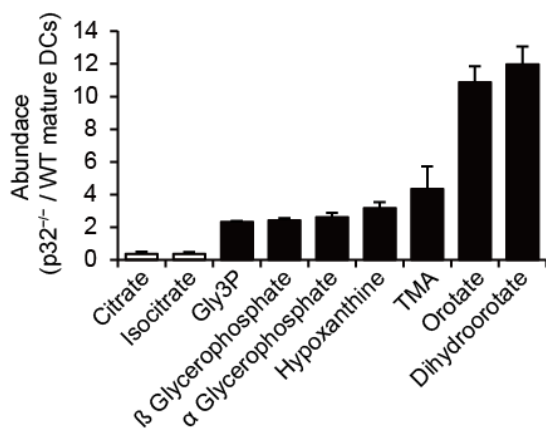
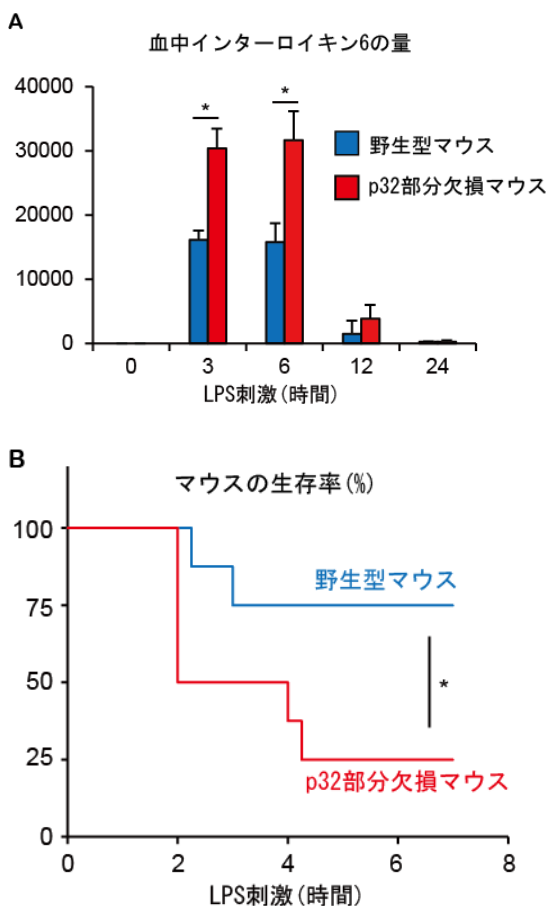


図2 代謝産物の測定

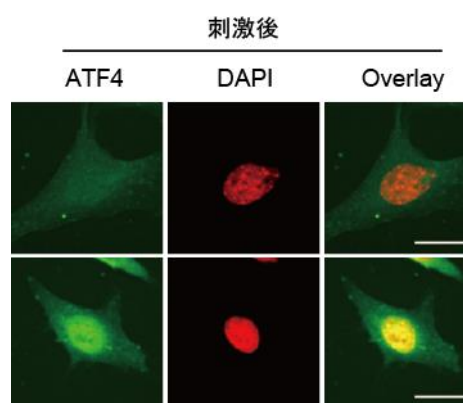
3. マウス敗血症モデルの解析

ミトコンドリアタンパク質の合成阻害が敗血症に影響を与えているかをマウスに LPS を投与する敗血症モデルを用いて解析した。野生型マウスは LPS 投与により血中インターロイキン6の量は増加するものの、肝臓の組織に大きな影響を与えずに大半が生存していた。一方で、p32 遺伝子がマクロファージなどのみで欠失したマウス (p32 部分欠失マウス) で解析したところ、LPS 投与後にマウスの血中の肝酵素、インターロイキン6の量が増加し、最終的にマウスの生存率が低下していた(下図)。



4. p32 欠損細胞のサイトカインを過剰に産生する分子メカニズムの解明

LPS 刺激の下流で作動する既知の分子群は p32 欠損線維芽細胞では増加していなかった。さらに解析を進めた結果、p32 欠損線維芽細胞では LPS で刺激すると ATF4 という分子の発現が増加している上に、核へと移行することが明らかとなった。p32 欠損線維芽細胞で ATF4 遺伝子を低下させるとインターロイキン6の量が野生型線維芽細胞と同程度まで減少した。これらの結果をまとめると、ミトコンドリア蛋白の合成を阻害すると、既存の炎症反応に加えて、ATF4 依存的に LPS に反応するインターロイキン6の量が増加することが明らかとなった。



前述した内容は、後述の雑誌論文3に掲載し、本研究助成の一環として、九州大学において、プレスリリースした。多くの新聞に取り上げられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- 異常 alpha-fetoprotein 分画の付加価値 - C 型肝硬変を併発した後腹膜原発胚細胞腫瘍症例を経験して - 相原正宗, 後藤和人, 丸山奏恵, 山中基子, 酒本美由紀, 鈴木秀生, 加藤正樹, 堀田多恵子, 康東天 臨床病理, 64(12), pp1353-1356, 2016 査読あり
- Serum depletion induced cancer stem cell-like phenotype due to nitric oxide synthesis in oncogenic HRas transformed cells Monji K., Uchiumi T., Hoshizawa S., Yagi M., Matsumoto T., Setoyama D., Matsushima Y., Gotoh K., Amamoto R., Kang D. Oncotarget, 15:7(46), pp75221-75234,

2016 査読あり

3. p32 is Required for Appropriate Interleukin-6 Production Upon LPS Stimulation and Protects Mice from Endotoxin Shock
Sasaki K., Gotoh K., Miake S., Setoyama D., Yagi M., Igami K., Uchiumi T., Kang D.
EBioMedicine, 20, pp161-172, 2017
査読あり
4. Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA
Matsuda S., Yasukawa T., Sakaguchi Y., Ichiyana K., Unoki M., Gotoh K., Fukuda K., Sasaki H., Suzuki T., Kang D.
Scientific Reports, 8(1), 5801, 2018
査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. 後藤和人, 瀬戸山大樹, 佐々木勝彦, 八木美佳子, 内海健, 康東天, マウス骨髄型樹状細胞におけるミトコンドリア依存代謝経路を制御する p32 の役割, 第 27 回日本生体防御学会学術総会, 2016
2. 後藤和人, 佐々木 勝彦, 瀬戸山 大樹, 伊神 恒, 堀田 多恵子, 内海 健, 康 東天, 樹状細胞の抗原提示における代謝解析, 第 63 回日本臨床検査医学会, 2016
3. 後藤和人, 石垣卓也, 山中基子, 酒本美由紀, 堀田多恵子, 康 東天, 九州大学病院における B 型肝炎再活性化予防における検査部の役割, 第 62 回日本臨床検査医学会九州地方会, 2017
4. 後藤和人, 瀬戸山大樹, 康東天, 樹状細胞を用いた代謝活性測定法の開発, 第 9 回福岡県医学会総会, 2017
5. 後藤和人, B 型肝炎再活性化における臨床検査専門医の役割, 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会, 2017
6. 後藤和人, 瀬戸山大樹, 八木 美佳子, 内海 健, Dongchon Kang, 樹状細胞の成熟におけるミトコンドリア p32 の役割, 第 17 回日本ミトコンドリア学会年会, 2017
7. Kazuhito Gotoh, Katsuhiko Sasaki, Daiki Setoyama, Dongchon Kang, p32 is required for appropriate interleukin-6 production upon LPS stimulation and protects mice from endotoxin shock, PNU-KU Joint Symposium, 2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/cc1m/>

九州大学病院 検査部

6. 研究組織

(1) 研究代表者 後藤 和人
(Kazuhito Gotoh)

九州大学病院・検査部・助教

研究者番号 : 50711214

(2) 研究分担者

本研究に関する研究分担者は申請時には計画されていない。

(3) 連携研究者

本研究に関する連携研究者は申請時には計画されていない。

(4) 研究協力者

本研究に関する研究協力者は申請時には計画されていない。