

令和元年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19768

研究課題名（和文）炎症制御におけるミトコンドリアの新規機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel mitochondrial functions in the regulation of inflammation

研究代表者

武田 弘資（TAKEDA, Kohsuke）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授

研究者番号：10313230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外に放出されたATPは、組織損傷の情報を免疫系に伝える危険信号（danger signal）として働く。本研究では、マクロファージなどの炎症性細胞が細胞外ATPに反応して炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1（IL-1）を放出する際のミトコンドリアの役割を検討した。その結果、ATPに対する受容体として機能するリガンド作動性イオンチャンネルP2X7の下流で、機能を保持したミトコンドリアがカルシウムを能動的に取り込むことが、細胞外ATPによるIL-1の効率の良い放出に重要な役割を担う可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、さまざまな疾患の病因あるいは増悪因子として慢性炎症が注目されていることから、炎症の程度や持続時間を制御する機構の解明が急務である。その足がかりとなるのが、炎症のトリガーとして働く炎症性サイトカインIL-1の産生機構の解明である。本研究では、IL-1の産生にミトコンドリアの機能が重要であることが明らかとなったことから、ミトコンドリアの機能を維持することが慢性炎症をコントロールする一つの方策となることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Extracellular ATP functions as a danger signal that transduces information on tissue damage to the immune system. In this research, we examined the role of mitochondria in the production and secretion of interleukin 1 (IL-1), an inflammatory cytokine, in inflammatory cells such as macrophages in response to extracellular ATP. We found that the intake of calcium by functional mitochondria downstream of the ligand-operated ion channel P2X7 that functions as a receptor for ATP appears to play an important role in ATP-induced IL-1 secretion.

研究分野：生化学

キーワード：炎症 ミトコンドリア インフラマソーム シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古くから口腔領域では、慢性歯周炎が歯周組織にとどまらず全身の疾患につながるという概念が一般的であった。最近その概念が広まり、慢性炎症を理解し、それをコントロールすることがさまざまな疾患の克服に必要であると考えられている。炎症の初期においては、マクロファージや樹状細胞などがインターロイキン-1 (IL-1) などのサイトカインを放出することで炎症が惹起される。この IL-1 が何らかの問題によって持続的に産生されてしまうと、炎症が必要以上に遷延化し、慢性炎症に至る。特に不顕性の慢性炎症が問題で、軽微であっても長期に及ぶ炎症は、恒常性を崩すのに十分なダメージを生体に与え、疾患の発症をもたらす。よって、IL-1 の産生をいかに正確に制御するかが、炎症の程度や持続時間を制御する上で重要な戦略の一つとなる。

炎症を誘導する様々な因子は、マクロファージや樹状細胞においてインフラマソーム (IFS) と呼ばれる細胞内タンパク質複合体を活性化し、IL-1 のプロセッシングと細胞外への放出を促す。主要な IFS の一つである NLRP3-IFS は、きわめて多様な刺激によって活性化されることが知られているが、その活性化の共通の機構としてミトコンドリアの機能低下が提唱されている。それに対して我々は、あらためて NLRP3-IFS 活性化におけるミトコンドリアの役割を検討するため、マウス骨髄由来マクロファージを刺激した際のインフラマソーム活性化にミトコンドリア脱共役剤 CCCP がどのような影響を与えるかを検討した。その結果、複数の NLRP3-IFS 活性化刺激のうち、細胞外 ATP によるインフラマソーム活性化のみを CCCP が抑制したことから、機能を維持したミトコンドリアが、細胞外 ATP による NLRP3-IFS の活性化を促進することが強く示唆された。よって、ミトコンドリアの機能低下が NLRP3-IFS 活性化の共通のメディエーターであるとの多くの研究者のこれまでの見解とは異なり、機能を維持したミトコンドリアが積極的にインフラマソームの活性を調節する機構が存在することが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、機能を維持したミトコンドリアが積極的にインフラマソームの活性を調節する機構を明らかにすることで、炎症制御におけるミトコンドリアの新規機能を理解し、慢性炎症をコントロールする足がかりを掴むことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態のライブイメージング解析

コラーゲンコートしたガラスベースディッシュに HEK293A 細胞を播種し、一晚培養後、 Ca^{2+} 感受性蛍光バイオプローブである CEPIA2mt の発現プラスミド (CEPIA2mt-pCMV-Myc)¹⁾、ATP 受容体である P2X7 の発現プラスミド (Flag-P2X7-pcDNA3)、ミトコンドリアマトリックス局在型の蛍光タンパク質の発現プラスミド (DsRed2-Mito-pcDNA3) をトランスフェクションした。24 時間後、細胞培養液を除去し、代わりに HBSS (25 mM HEPES、150 mM NaCl、4 mM KCl、1.8 mM $CaCl_2$ 、1 mM $MgCl_2$ 、5.6 mM Glucose) を加えたのちに、共焦点レーザー顕微鏡 Carl Zeiss LSM710 を用いてタイムラプス解析を行った。CEPIA2mt については励起光 488 nm、蛍光波長 492-540 nm の蛍光強度を、DsRed2-Mito については励起光 543 nm、蛍光波長 550-670 nm の蛍光強度をそれぞれ検出した後、ZEN 2.5 lite (Carl Zeiss Microscopy) で CEPIA2mt 由来の蛍光強度を数値化し、

$$Ca^{2+} \text{の量 (相対値)} = \text{CEPIA2mt の蛍光強度} / \text{DsRed2-Mito の蛍光強度}$$

として解析することにより、ミトコンドリアマトリックスの容積変化による影響を除外した。CEPIA2mt 由来の蛍光強度 (F) は、定常状態の蛍光強度の平均 (F_0) で標準化し (F/F_0)、5 つ以上の細胞の平均として算出した。

(2) マウス腹腔内マクロファージにおける NLRP3-IFS 活性化の検討

8-12 週齢の C57BL/6J マウスの腹腔内に 4% 液体チオグリコレート培地 2 mL を注射し、2 日後にマウスを頸椎脱臼法により安楽死させ、氷冷した PBS 10 mL を充填した注射器および 23G の注射針を用いて腹腔内に滲出してきた細胞を回収した。採取した細胞は 40 μm のセルストレーナーにて不溶物を除去した後、1,500 rpm にて 10 分間遠心分離した。その細胞を 8% FBS を含む RPM-1640 を用いてディッシュに播種し、その 1 時間後、マクロファージ以外の細胞を除去するために PBS で 2 回洗浄し、さらに同様の培養条件下で一晩培養を行った。その細胞を 24 well プレートに播種し、各種実験に供した。

NLRP3-IFS 活性化刺激を行う前に培養上清を除去したのち、100 ng/mL LPS を添加した Opti-MEM を加えた。その 4 時間後に PBS で 2 回洗浄を行った後、Opti-MEM に交換し、各種 NLRP3-IFS 活性化刺激を行った。一定量の培養上清を回収し、ELISA にて IL-1 を定量した。残りの培養上清にはサンプルと同量の 100% メタノールおよび 1/4 量のクロロホルムを加えてボルテックスで十分混和した後、-20 に 10 分間静置した。その後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、中間層を吸わないよう注意しながら上清のみを除去した。さらにサンプルと同量の 100% メタノールを再び加えてボルテックスで十分混和した後、-20 に 10 分間静置した。その後、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、ペレットを吸わないように上清のみを除去した。次にクロロホルムを完全に除去するために、100% メタノールをサンプルの 2 倍量加えて、15,000 rpm

で 3 分間遠心分離し、上清を完全に除去した。その後、沈殿を風乾させ、SDS sample buffer で沈殿を溶解し、上清サンプルとした。細胞については、SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl [pH8.5]、20% グリセロール、4% SDS、10 mM DTT) を用いて直接溶解し、1 分間超音波処理を行ったものを細胞サンプル(細胞抽出液)とした。これらのサンプルをウェスタンブロット解析に供し、培養上清に放出された IL-1 や細胞内での NLRP3-IFN γ 構成分子の変化などを検討した。

4. 研究成果

細胞外 ATP による NLRP3-IFN γ の活性化にミトコンドリアの機能が重要とされることから、まず、マクロファージ系の細胞において、細胞外 ATP に対する応答に重要な役割を担うことが知られているリガンド作用性イオンチャネル P2X7 に着目した。P2X7 は細胞外 ATP による NLRP3-IFN γ の活性化に必須と考えられているが、同時に P2X7 は細胞内に Ca²⁺を流入させることが知られている。そこで、ATP 刺激による Ca²⁺流入が NLRP3-IFN γ の活性化に与える影響を検討した結果、Ca²⁺の流入は ATP 刺激による NLRP3-IFN γ の活性化には必要なく、むしろ Ca²⁺の過剰流入は NLRP3-IFN γ を抑制することが分かった。また、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP は ATP 刺激による NLRP3-IFN γ の活性化を抑えるが、その際の CCCP による NLRP3-IFN γ の阻害には細胞外からの Ca²⁺流入が必要であることが明らかとなった。よって、ミトコンドリアが Ca²⁺を積極的に取り込むことによって、細胞外 ATP 刺激時の細胞内 Ca²⁺の濃度や分布が適正に保たれ、NLRP3-IFN γ の活性化が促進されるのではないかと予想した。

そこで、内在性に P2X7 を発現していない HEK293 細胞に、Ca²⁺感受性蛍光バイオプローブ CEPIA2mt を P2X7 と共に発現させて ATP 刺激を加えたところ、ミトコンドリアへの急速な Ca²⁺流入が確認された。この流入は、CCCP や電子伝達系阻害剤 antimycin A によって抑制される一方、CCCP とは作用機序の異なる脱共役剤 valinomycin では抑制されなかった。このような化合物による阻害プロファイルは、マウス腹腔内マクロファージにおける細胞外 ATP による NLRP3-IFN γ の活性化に対する阻害プロファイルと一致していた。一方、カルシウムイオノフォア A23187 によってもミトコンドリアへのカルシウム流入が促進されるが、その際には CCCP による抑制は認められなかったことから、細胞外 ATP 刺激時においては P2X7 の下流においてミトコンドリア自身が能動的に Ca²⁺を取り込む機構が存在することが示唆され、その機構が細胞外 ATP による NLRP3-IFN γ の活性制御に重要な役割を担っていると考えられる。

一方、以前我々は、化合物スクリーニングによって細胞外 ATP による NLRP3-IFN γ の活性化を選択的に抑制する化合物を同定しているが、そのうちの 2 化合物が共通して抑制するプロテインキナーゼ X (PKX) についても解析を進めたところ、PKX が P2X7 を介して ATP 刺激によって活性化されるが、細菌性毒素 nigericin や抗ウイルス薬 R837 など、NLRP3-IFN γ 活性化剤として良く用いられる他の刺激によっては活性化されないことが分かった。さらに、マウス腹腔マクロファージで PKX をノックダウンすると、ATP 刺激による IL-1 の細胞外放出が低下する傾向が認められたことから、PKX が ATP 刺激による NLRP3-IFN γ の活性化を促進する分子であることが示唆された。

今後は、マウス初代培養マクロファージにおいてもミトコンドリア内 Ca²⁺の測定系を確立し、ミトコンドリアによる Ca²⁺調節と NLRP3-IFN γ の活性化との関連をさらに探ると同時に、その調節機構に PKX が関わるかどうかを中心に詳細な分子メカニズムを明らかにしていきたい。

<引用文献>

- 1) Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., Iino, M.. Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* 5, 1–13 (2014)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Yamaguchi, A., Ishikawa, H., Furuoka, M., Yokozeki, M., Matsuda, N., Tanimura, S., Takeda, K. Cleaved PGAM5 is released from mitochondria depending on proteasome-mediated rupture of the outer mitochondrial membrane during mitophagy. *J. Biochem.* 査読有, 165, 19-25 (2019)
doi: 10.1093/jb/mvy077
2. Cheng, R., Takeda, K., Naguro, I., Hatta, T., Iemura, S., Natsume, T., Ichijo, H., Hattori, K. β -TrCP-dependent degradation of ASK1 suppresses the induction of the apoptotic response by oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 査読有, 1862, 2271-2280 (2018)
doi: 10.1016/j.bbagen.2018.07.015
3. Tanimura, S., Takeda, K. ERK signalling as a regulator of cell motility. (Review article) *J. Biochem.* 査読有, 162, 145-154 (2017)

doi: 10.1093/jb/mvx048

4. Kamiyama, M., Shirai, T., Tamura, S., Suzuki-Inoue, K., Ehata, S., Takahashi, K., Miyazono, K., Hayakawa, Y., Sato, T., Takeda, K., Naguro, I., Ichijo, H. ASK1 facilitates tumor metastasis through phosphorylation of an ADP receptor P2Y12 in platelets. *Cell Death Differ.* 査読有, 24, 2066-2076 (2017)
doi: 10.1038/cdd.2017.114
5. Chaikuad, A., Filippakopoulos, P., Marcisin, S. R., Picaud, S., Schröder, M., Sekine, S., Ichij, H., Engen, J. R., Takeda, K., Knapp, S. Structures of PGAM5 provide insight into active site plasticity and multimeric assembly. *Structure* 査読有, 25, 1089-1099 (2017)
doi: 10.1016/j.str.2017.05.020
6. Sadatomi, D., Nakashioya, K., Mamiya, S., Honda, S., Kameyama, Y., Yamamura, Y., Tanimura, S., Takeda, K. Mitochondrial function is required for extracellular ATP-induced NLRP3 inflammasome activation. *J. Biochem.* 査読有, 161, 503-512 (2017)
doi: 10.1093/jb/mvw098
7. Honda, S., Sadatomi, D., Yamamura, Y., Nakashioya, K., Tanimura, S., Takeda, K. WP1066 suppresses macrophage cell death induced by inflammasome agonists independently of its inhibitory effect on STAT3. *Cancer Sci.* 査読有, 108, 520-527 (2017)
doi: 10.1111/cas.13154

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 山口 文音、石川 颯、横関 雅史、堀川 幸一郎、柴田 健太郎、谷村 進、武田 弘資：ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 による核タンパク質のリン酸化の制御。第 18 回 日本ミトコンドリア学会年会 2018/12/9
2. 亀山 由佳、蛭原 燦雄、横関 雅史、野田 拓磨、谷村 進、武田 弘資：P2X7 を介した細胞外 ATP シグナルによるミトコンドリア内カルシウムの制御。第 18 回 日本ミトコンドリア学会年会 2018/12/7
3. 福田 香凜、酒井 康介、中邨 翔太、武田 弘資、谷村 進：細胞運動阻害タンパク質 SH3P2 の新規結合分子の探索。第 35 回 日本薬学会九州支部大会 2018/11/18
4. 日高 葵、本田 詩乃、西川 恵、野田 拓磨、武田 弘資：パイロトーシス抑制化合物の探索を目的としたハイスループットスクリーニング系の構築。第 35 回 日本薬学会九州支部大会 2018/11/18
5. Takeda K: Mechanisms linking mitochondrial stress sensing to cellular response. Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13) 2018/10/23
6. 谷村 進、武田 弘資：1 型ミオシン myosin 1E と細胞膜変形タンパク質 SNX9 の相互作用を介した細胞運動制御。第 77 回 日本癌学会学術総会 2018/9/28
7. 武田 弘資：ミトコンドリアのストレス感知と細胞応答をつなぐ機構。第 91 回 日本生化学会大会 2018/9/26
8. 石川 颯、山口 文音、横関 雅史、柴田 健太郎、堀川 幸一郎、谷村 進、武田 弘資：ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 によるマイトファジーの制御 第 91 回 日本生化学会大会 2018/9/25
9. 山口 文音、石川 颯、横関 雅史、堀川 幸一郎、柴田 健太郎、谷村 進、武田 弘資：ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 による核タンパク質のリン酸化制御。第 17 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2018 2018/9/1
10. 中邨 翔太、増山 律子、酒井 康介、福田 香凜、武田 弘資、谷村 進：Myosin1E の細胞質アンカータンパク質 SH3P2 は破骨細胞の分化を制御する。平成 30 年度 日本生化学会九州支部例会 2018/7/1
11. Honda S, Hidaka A, Nishikawa M, Noda T, Takeda K: Exploration of pro-inflammatory death of macrophages using small compounds. Australia-Japan Meeting on Cell Death 2018/5/22-23
12. 谷村 進、中邨 翔太、田川 克希、酒井 康介、福田 香凜、堤 健、武田 弘資：ERK シグナルによる細胞運動制御を担う SH3P2-Myosin1E 複合体。日本薬学会 第 138 年会 2018/3/27
13. 本田 詩乃、日高 葵、西川 恵、武田 弘資：低分子化合物で探るマクロファージの炎症誘

導性細胞死の機構 . 日本薬学会 第 138 年会 2018/3/26

14. 本田 詩乃、武田 弘資 : マクロファージの炎症誘導性細胞死を抑制する低分子化合物の同定とその抑制機構の解析 . 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議 2018/1/30-2/1
15. 古岡 真菜、尾崎 恵一、谷村 進、武田 弘資 : 3T3-L1 細胞の TNF- 応答における NLRP3 の役割 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/7
16. 横関 雅史、山口 文音、石川 颯、堀川 幸一郎、谷村 進、武田 弘資 : 切断型 PGAM5 による選択的 pre-mRNA スプライシングの制御 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6
17. 谷村 進、田川 克希、有近 直也、山中 智絵、福田 香凜、武田 弘資 : 1 型ミオシン myosin 1E と細胞膜変形タンパク質 SNX9 による細胞運動制御 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6
18. 中塩屋 和孝、亀山 由佳、蛸原 燦雄、貞富 大地、谷村 進、武田 弘資 : NLRP3 インフラマソーム活性化におけるミトコンドリアによる Ca^{2+} 調節の役割 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6
19. 中邨 翔太、増山 律子、酒井 康介、貞富 大地、武田 弘資、谷村 進 : Myosin 1E の細胞質アンカータンパク質 SH3P2 による破骨細胞の分化制御 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6
20. 武田 弘資 : ミトコンドリアのストレス感知機構と細胞応答 . 第 160 回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会シンポジウム 2017/9/13
21. 本田 詩乃、日高 葵、中塩屋 和孝、武田 弘資 : NLRP3 インフラマソーム活性化にともなうマクロファージの細胞死を抑制する低分子化合物の同定とその抑制機構の解析 . 平成 29 年度 日本生化学会九州支部例会 2017/5/13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/cell/index-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 : なし

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。