

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791337  
 研究課題名（和文） 自然免疫系におけるファゴサイトーシスの分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Studies on molecular mechanism of phagocytosis in innate immune system  
 研究代表者  
 長谷部 晃（HASEBE AKIRA）  
 北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：90281815

研究成果の概要：マイコプラズマのリポタンパク質に由来する活性リポペプチドである FSL-1 を用いて、自然免疫において重要な役割を果たすファゴサイトーシスの分子メカニズムについて調べている。2007 年度は、FSL-1 はマクロファージに取り込まれ、その取り込みはクラスリン依存的事であること、ならびにその取り込みは FSL-1 の受容体である TLR2 非依存的事であること明らかにした。しかしながら FSL-1 の取り込みに重要な受容体は不明のままであった。そこで 2008 年度は、FSL-1 の取り込みに重要な受容体を検索し、CD14 ならびに CD36 が重要であることを明らかにした。これらの詳細なデータは論文にまとめたところであり、国際的な学術雑誌に投稿中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージなど食細胞による phagocytosis (食作用) は生体防御に必須の役割を果たしている。食細胞は、まず生体に侵入した微生物などの異物を捕捉し、膜で囲んで phagosome (食胞) を形成、細胞骨格を変化させて phagosome を細胞内へと輸送する。このようにして取り込んだ異物を細胞内で

処理し、さらに MHC 分子に結合させて T 細胞に抗原提示する。このように、phagocytosis は自然免疫ならびに獲得免疫における重要な一端を担っている。我々ならびにいくつかの報告で、phagocytosis が p38 MAP キナーゼで制御されていることが明らかにされた。p38 はサイトカインやストレス刺激のシグナル伝達で重要な役割を果たしている MAP キナー

一ゼの一つである。我々は、これまでにマイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド (FSL-1) による Toll-like receptor (TLR) 2 を介する活性化ならびにアポトーシスにおいて p38 が関わっていることを明らかにした。また、TLR2 を介する FSL-1 の刺激シグナルによりマクロファージの貪食活性が増強されることを明らかにしており、さらに、p38 のインヒビター (SB203580) がマクロファージの *E. coli* ならびに *S. aureus* に対する貪食活性を抑制することも明らかにした。これらのことから、p38 が phagocytosis に何らかの役割を果たしていることがわかるが、その詳細なメカニズムは不明なままである。このメカニズムを解明するために、我々はまず Rab protein family に注目した。その理由は以下の通りである。Rab protein family は細胞内輸送において、輸送小胞の標的小胞への融合の制御に関わるタンパク質である。Rab protein family は、GDP と結合した不活性化状態と GTP と結合した活性化状態を繰り返すことで機能しており、細胞質において、GDP に結合し不活性化型の状態保持をする GDP/GTP 交換反応抑制タンパク質 (GDI) と結合する。そして、p38 が Rab protein family のひとつである Rab5 と GDI の複合体形成を制御していることが明らかになったことからである。以上のようなことから、phagocytosis の詳細なメカニズムを解明し、自然免疫による生体防御システムの新たな一面を明らかにすることが出来るものと考え、この研究を行っている。

## 2. 研究の目的

上記のように、自然免疫における phagocytosis の分子メカニズムを研究することで生体防御システムの新たな一面を明らかにすることが、本研究の目的である。なお、これまでのところ TLR を介したシグナルが phagocytosis においてどのような役割を果たしているかについての報告はあるが未だ不明な点が多く残されている。我々の研究を含めて自然免疫と獲得免疫の橋渡しとなるこれらの研究は、免疫学的な重要性が増してきているところである。

## 3. 研究の方法

FSL-1 を蛍光色素フルオレセインイソシアネート (FITC) で標識し、取り込まれた FITC-FSL-1 を共焦点レーザー顕微鏡ならびにフローサイトメータで検出して調べた。取り込みの経路についてはナスタチンとクロルプロマジンメチルβサイクロデキストリンなどのエンドサイトーシス阻害剤を用いて調べた。ナスタチンはカベオラ・ラフト依存的な経路を、クロルプロマジンはクラスリン依存的な経路を、メチルβサイク

ロデキストリンは上記両方の経路を阻害することが知られている。また、クラスリンのメッセンジャー RNA に対する small interfering RNA をトランスフェクトする RNAi 法の影響、ならびに共焦点レーザー顕微鏡によるクラスリンと FITC-FSL-1 の共局在などを確認することで FSL-1 の取り込み経路を調べた。FSL-1 の取り込みにおける TLR2 の役割は、TLR2 と FITC-FSL-1 の細胞内共局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べ、さらに TLR2 を正常に発現しているマウス (TLR2<sup>+/+</sup>) と TLR2 を欠損しているマウス (TLR2<sup>-/-</sup>) の腹腔浸出マクロファージによる FSL-1 の取り込みを調べることで確認した。さらに、Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞に CD14 あるいは CD36 を安定的に発現させた細胞株を樹立し、これらの細胞による FSL-1 の取り込みを調べることで、FSL-1 の取り込みにおける CD14 ならびに CD36 の役割を調べた。Rab protein についてはウェスタンブロッティング法で調べた。

## 4. 研究成果

本研究により、FSL-1 はマクロファージに取り込まれ、その取り込みはクラスリン依存的事であること、ならびにその取り込みは FSL-1 の受容体である TLR2 非依存的事であることがわかった (図 1、図 2A と B、図 3)。

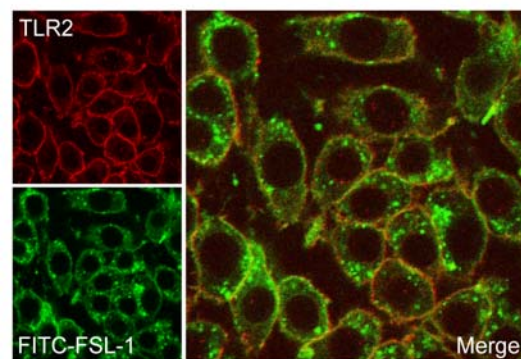


図 1. マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞による FSL-1 の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。TLR2 (赤) と FITC-FSL-1 (緑) はそれぞれ細胞内で確認されるが、重ね合わせ画像黄色くなる部分がないので TLR2 と FITC-FSL-1 の共局在がないことがわかる。

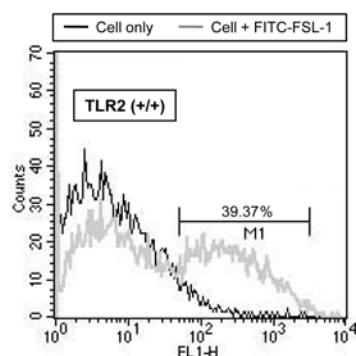


図 2A.

TLR2 (+/+) マウスマクロファージによる FSL-1 の取り込みをフローサイトメータで確認した。グレーの線が取り込みの程度を表す。

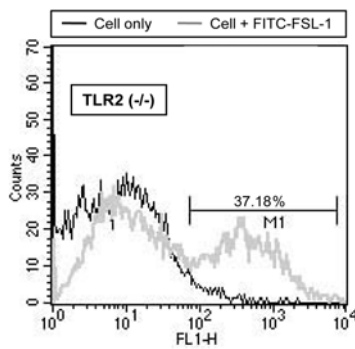


図 2B. TLR2 (-/-) マウスマクロファージによる FSL-1 の取り込みをフローサイトメータで確認した。グレーの線が取り込みの程度を表す。

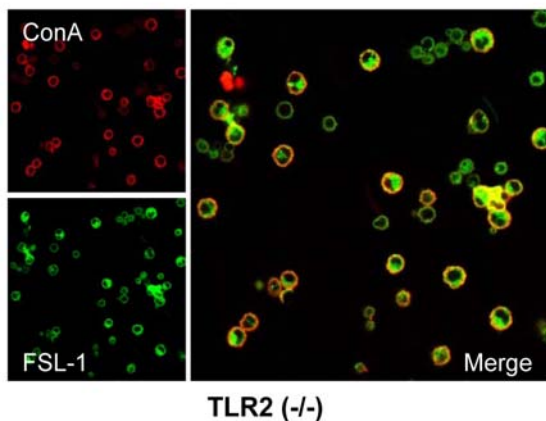
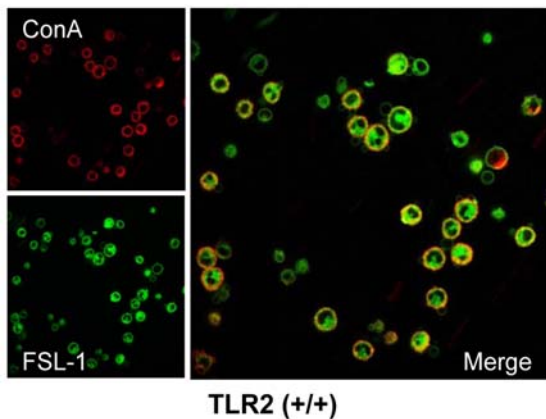


図 3. TLR2 (+/+) と TLR2 (-/-) マウス由来の腹腔浸出マクロファージによる FITC-FSL-1 の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。細胞の表面を赤色蛍光色素と結合した Concanavalin A で染色し、細胞内に取り込まれた FSL-1 のレベルに差がないことがわかった。

さらに、実際の FSL-1 の取り込みには CD14 ならびに CD36 が重要であることを明らかにした (図 4)。これらの詳細なデータは現在論文にまとめているところであり、国際的な学術雑誌への投稿する予定である。

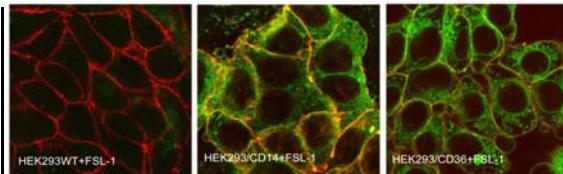


図 4. 野生型 HEK293 細胞 (左)、CD14 安定発現 HEK293 細胞 (中) と CD36 安定発現 HEK293 細胞 (右) による FSL-1 の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。

さらに、ファゴサイトーシスなどにおける膜輸送で重要な役割を果たす Rab protein のうち、Rab5 はマクロファージにおいて、FSL-1 刺激によりメッセンジャー RNA の発現が一過性に低下することがリアルタイム PCR 法により確認されたが、ウェスタンブロッティングの結果から、タンパクとしてはメッセンジャー RNA の場合と反対に刺激後 6 時間まで増加することがわかった (図 5)。



図 5. マウスマクロファージ系 RAW264.7 細胞を FSL-1 で刺激したときの経時的な Rab5 の発現をウェスタンブロッティング法で調べた。

これまで、TLR2 の刺激が Rab5 の発現に影響を与えるという報告はないため、この発現の上昇とファゴサイトーシスの変化との関連性、ならびに FSL-1 刺激による Rab5 の発現上昇に関与する経路、また、他の TLR リガンドでも同様なことが起きるのか、そして Rab5 発現の減少が具体的に自然免疫系においてどのような影響を及ぼしているか詳細に研究することが重要であると言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① 長谷部 晃, Haque M. Shamsul, 柴田 健一郎. TLR2 リガンドの取り込み機序、臨床免疫・アレルギー科, 50: 162-166, 2008 年、査読無

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 長谷部 晃, 伊従 光洋, 柴田 健一郎. マクロファージによるジアシルリポペプチド FSL-1 の取り込みについて. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12~14 日. 名古屋
- ② 長谷部 晃, 伊従 光洋, 木浦 和人, 大谷 誠, 柴田 健一郎. ジアシルリポ

ペプチド FSL-1 刺激により誘導されるマクロファージの遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 取り込み様式. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1~3 日. 京都

- ③ Hasebe A., Shamsul H. M., Iyori M., Kiura K., Ohtani M., Shibata K. "The uptake manner of the diacylated lipopeptide FSL-1 by macrophages" Regulation in Innate Immunity - from Recognition Molecules to Antimicrobial Peptides. 2008/10/28~29. Sapporo.
- ④ 長谷部 晃、シャムスル ハク、伊従光洋、木浦 和人、大谷 誠、柴田 健一郎. マクロファージにおけるジアシルリポペプチド FSL-1 刺激により誘導される遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 取り込み様式について. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会. 2008 年 9 月 23~25 日. 東京
- ⑤ 長谷部 晃、モハメド シャムスル ハク、伊従 光洋、木浦 和人、大谷 誠、柴田 健一郎. ジアシルリポペプチド FSL-1 による刺激で誘導されるマクロファージの遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 の取り込み様式. 第 76 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2008 年 9 月 6 日 札幌
- ⑥ 長谷部 晃、モハメド シャムスル ハク、伊従 光洋、木浦 和人、大谷 誠、柴田 健一郎. マクロファージにおけるジアシルリポペプチド FSL-1 刺激により誘導される遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 の取り込み様式. 自然免疫の最前線 -3 学会合同大会 2008- 第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第 19 回日本生体防御学会学術総会・第 45 回補体シンポジウム. 2008 年 7 月 10~12 日. 札幌.
- ⑦ 長谷部 晃、モハメド シャムスル ハク、伊従 光洋、木浦 和人、大谷 誠、柴田 健一郎. マクロファージにおけるジアシルリポペプチド FSL-1 刺激による遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 の取り込み様式. 日本マイコプラズマ学会 第 35 回学術集会. 2008 年 5 月 30~31 日. 東京.
- ⑧ 長谷部 晃、伊従 光洋、安田 元昭、木浦 和人、柴田 健一郎. マクロファージのジアシルリポペプチド FSL-1 刺激

による遺伝子発現の網羅的解析と FSL-1 の取り込み様式について. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会. 2007 年 11 月 20~22 日. 東京.

- ⑨ 長谷部 晃、モハメド シャムスル ハク、伊従 光洋、安田 元昭、木浦 和人、柴田 健一郎. マクロファージにおけるジアシルリポペプチド FSL-1 刺激による遺伝子発現の網羅的解析ならびに FSL-1 の取り込み様式について. 第 75 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2007 年 9 月 8 日. 札幌
- ⑩ 長谷部 晃、ハク モハメド、伊従 光洋、安田 元昭、木浦 和人、柴田 健一郎. マクロファージにおける FSL-1 の取り込み様式と遺伝子発現の網羅的解析. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2007 年 8 月 30~31 日. 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：90281815

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし