

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658094

研究課題名(和文)メタボリック症候群改善を目指したマクロファージの細胞移動抑制因子の探索

研究課題名(英文)Studies of factors that inhibit the macrophage migration

研究代表者

木岡 紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90234179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：メタボ症候群発症のカギとなっている脂肪組織へのマクロファージ(M<sub>1</sub>)の遊走にはCAPタンパク質が関与している。本研究ではまずM<sub>1</sub>の細胞遊走アッセイ系を構築した。次にM<sub>1</sub>細胞株のCAPの発現を抑制した細胞株とCAP遺伝子を再発現した細胞株を作成した。CAP発現抑制M<sub>1</sub>では細胞遊走は亢進し、CAPの再発現により細胞遊走が回復した。CAP発現抑制M<sub>1</sub>とCAP再発現細胞の細胞遊走能を比較することによって、CAPに依存したM<sub>1</sub>の細胞遊走の測定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Macrophage invasion into adipose tissues plays a critical role for metabolic syndrome. An adaptor protein, CAP, is involved in the invasion of macrophages. Here we established the assay system for CAP-dependent macrophage migration. First we determined the optimum condition for examining macrophage migration. Then, expression of CAP was depleted in macrophage-like cells by shRNA for CAP. We found that CAP depletion promoted the macrophage migration estimated by xCELLigence. Re-expression of CAP isolated from macrophages rescued the migration. This system can be used for investigation of CAP-dependent macrophage migration.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：メタボリック症候群 糖尿病 マクロファージ 細胞遊走 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

近年の食習慣の変化に伴い、インスリン抵抗性、2型糖尿病などを含むメタボ症候群は急速に増加しつつあり、現在では中高年の男性のうち二人に一人はメタボ症候群または予備軍と推測されている。最近、肥満に伴い脂肪組織へマクロファージが浸潤(脂肪組織の最大40%がマクロファージとなる)し、そこで持続性の炎症を起こすこと(慢性炎症)がメタボ症候群の重要な引き金であることがわかってきた。脂肪組織の慢性炎症は、筋肉などの代謝組織の機能変化も引き起こし、全身でのインスリン感受性の低下、2型糖尿病発症へとつながる。実際マクロファージの脂肪組織への浸潤を組織特異的遺伝子破壊により抑制すると、耐糖能/インスリン感受性が改善したと報告されている。

Sorbs タンパク質ファミリー(CAP、ピネキシン、ArgBP2)は、細胞増殖シグナルと細胞接着に参与する。特にCAPはインスリンシグナルに参与すること、ArgBP2は膵臓がんのがん抑制遺伝子として働くこと、またピネキシンは創傷治癒に関わることが明らかとなっており、Sorbs タンパク質ファミリーに注目が集まっている。最近CAP(c-Cbl associating protein)の遺伝子破壊マウスおよび骨髄特異的遺伝子破壊マウスでは、高脂肪食時のマクロファージの脂肪細胞への浸潤が低下し、慢性炎症の低下と耐糖能の改善、インスリン感受性の向上がみられることが報告された。一方で、脂肪組織などではCAPの発現が高いにもかかわらず、異常は見られなかった。これは、他の組織ではピネキシンなどの別のSorbsファミリー分子がCAP機能を相補しているためだと考えられている。

以上のような状況から、マクロファージにおけるCAPの機能を阻害すれば、マクロファージの脂肪細胞への浸潤が抑制され、メタボ症候群の予防、改善が期待される。他組織でCAPの機能が阻害されてもピネキシンなどのファミリー分子により相補され副作用は最小限にとどめられると期待できる。しかし、マクロファージの浸潤(細胞遊走などのステップを含む)におけるCAPの役割は解明されておらず、他のファミリー分子の関与もよくわかっていない

## 2. 研究の目的

本研究では、マクロファージの脂肪細胞への浸潤を特異的に抑えることを最終目標として、CAPのケモタキシス、細胞遊走などにおける役割を明らかにする。CAPの標的タンパク質(CAPはアダプタータンパク質なので、標的は結合タンパク質と予想している)とCAP(およびピネキシン、ArgBP2)との結合能を比較する。また、CAPに依存した細胞

遊走能を定量化するアッセイ系を構築し、マクロファージの浸潤を抑制する因子の探索系を構築する。

## 3. 研究の方法

(1)マクロファージの細胞遊走に対するCAPの効果を明らかにするために、まずRaw264.7細胞において内在的に発現しているCAPの発現をshRNAベクターを用いて抑制した。また、CAP発現抑制細胞にshRNA耐性のCAPを再発現させた。これらの細胞構築には、100%の効率で導入でき安定抑制細胞、安定発現細胞が簡単に作成できるレンチウイルスベクターを用いた。細胞の遊走は、in vitro創傷治癒アッセイ(スクラッチ法)およびxCELLigenceリアルタイム細胞解析装置を用いた。

(2)ArgBP2、CAP、ピネキシンの3種類のタンパク質について大腸菌でGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)融合タンパク質として発現させ、精製した。これら融合タンパク質と標的タンパク質の結合はグルタチオンビーズを用いたプルダウンアッセイ法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1)細胞株の構築

まず、マクロファージ細胞株で発現しているSorbsファミリータンパク質の発現量をウエスタンブロット法で調べた。その結果、Raw264.7細胞株では、CAP発現しているが、ピネキシンとArgBP2発現していないことが確認できた。そこで、この細胞株を用い、CAPの非発現マクロファージ細胞株の構築を行った。5種類のshRNA発現レンチウイルス用ベクターを作成し、Raw264.7細胞に導入した。5種類のshRNAベクターのうち、2種類のshRNAベクターで効率よくCAPの発現が抑制された。以上より、CAPの発現抑制マクロファージ細胞株の構築に成功した。

次に、shRNAによる遺伝子発現抑制は、しばしばオフターゲット効果と呼ばれる非特異的効果を引き起こす。オフターゲット効果と特異的効果を区別するために、CAP発現抑制細胞にshRNA耐性CAP遺伝子を再導入した細胞を作成した。ウエスタンブロットの結果から、再発現CAPは野生型細胞で見られるCAPよりも高いレベルで発現していることが確認できた。

### (2)細胞遊走能の測定

(1)で作成した細胞の遊走能を創傷治癒アッセイとxCELLigenceを用いて測定した。CAPの発現抑制細胞は、創傷治癒アッセイでは遊走能が低下していたのに対し、xCELLigenceを用いたアッセイでは遊走能が亢進していた。創傷治癒アッセイは2次元の方向性のある

る細胞遊走の能力を測定するものである。一方、xCELLigence は 8 μm のポアのある膜の上面から下面に移動した細胞を測定するものであり、3 次元の細胞遊走能を評価できる。したがって、CAP は 2 次元細胞遊走と 3 次元細胞遊走で異なる役割を持つことが示唆された。

しかし、CAP 発現抑制細胞に CAP 遺伝子を再導入した細胞の遊走能を測定したところ、創傷治癒アッセイでも xCELLigence を用いた細胞遊走アッセイでも細胞遊走能の回復は見られなかった。原因として、1) 上記の CAP 発現抑制細胞で見られた細胞遊走能の変化はオフターゲット効果によるもの、2) 再導入した CAP 遺伝子が機能していないため、再導入細胞では遊走能の回復が見られない、の可能性が考えられた。とくに今回再導入に用いた CAP 遺伝子(マウス繊維芽細胞より単離したもの)から作られる CAP タンパク質とマクロファージで発現している CAP タンパク質の大きさが異なっていたことから、2) の可能性が高いと考え、以下の実験を行った。

(3) マクロファージ特異的 CAP 遺伝子の単離と再発現細胞の作製、細胞遊走能の検証

Raw264.7 マクロファージ細胞株から mRNA を抽出し、cDNA を合成後、PCR により CAP 遺伝子を増幅、単離した。この CAP の塩基配列を決定したところ、主要なものは、繊維芽細胞で発現していた CAP 遺伝子と、2 か所(84 塩基の挿入と 60 塩基の欠失)異なっていることが判明した。

マクロファージ特異的 CAP を CAP 発現抑制細胞に再導入し、再発現細胞を作成した。この細胞の細胞遊走能を創傷治癒アッセイ、xCELLigence で測定したところ、いずれのアッセイにおいても CAP 発現抑制によってみられていた効果が回復傾向を示した。このことから、CAP は繊維芽細胞とマクロファージでは異なるスプライシングバリエーションが発現しており、細胞遊走における役割も異なっていることがわかった。

(4) CAP, ArgBP2 の精製と標的タンパク質との相互作用の検討

これまでに Sorbs ファミリータンパク質のうち、ピネキシンの大腸菌内発現、精製系は確立されていた。一方、CAP, ArgBP2 については発現精製が行われていなかった。そこで、今回 CAP と ArgBP2 の大腸菌での発現、精製を行った。CAP と ArgBP2 の全長遺伝子を低温誘導型ベクター pCold-GST ベクターに組み込み、低温により発現誘導を行った。CAP, ArgBP2 いずれも若干の分解物を含んでいたが、全長タンパク質の精製に成功した。この精製タンパク質を用い、Sorbs ファミリータンパク質の標的(結合)タンパク質と考えられているピンキュリンと アクチニンへの結合について、プルダウンアッセイにより検討した。その結果、ファミリー分子のう

ち、CAP が最も強くピンキュリンと結合し、一方 ArgBP2 が アクチニンと最も強く結合した。このことから、Sorbs ファミリータンパク質は共通の結合相手を持つものの、その親和性は異なっていることが判明した。

以上の結果より、CAP は他の Sorbs ファミリータンパク質とは異なる親和性で標的タンパク質と結合していること、および繊維芽細胞とマクロファージで発現している CAP タンパク質は異なる機能を持っていることを明らかにした。さらに、本研究により CAP の発現を抑制した細胞と再発現した細胞の遊走能を比較することで、CAP の発現に依存した細胞遊走の評価することが可能となった。この実験系を利用すれば、CAP に依存した細胞遊走を抑制するような食品因子のスクリーニングが可能となると考えられる。

#### 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 5 件)

**Tomiyama, L., Sezaki, T., Matsuo, M., Ueda, K. and Kioka, N.** (2014). Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. *Oncogene*. In press (10.1038/onc.2014.31) 査読有

**Yamashita, H., Ichikawa, T., Matsuyama, D., Kimura, Y., Ueda, K., Craig, S. W., Harada, I. and Kioka, N.** (2014). Interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin alpha in sensing extracellular matrix stiffness. *Journal of cell science*. In press (10.1242/jcs.133645) 査読有

**Sezaki, T., Tomiyama, L., Kimura, Y., Ueda, K. and Kioka, N.** (2013). Dlg5 interacts with the TGF-beta receptor and promotes its degradation. *FEBS letters* **587**, 1624-9. (10.1016/j.febslet.2013.04.015) 査読有

**Chen, K., Gao, L., Liu, Y., Zhang, Y., Jiang, D. S., Wei, X., Zhu, X. H., Zhang, R., Chen, Y., Yang, Q., Kioka, N., Zhang, X. D., and Li, H.** (2013). Vinexin-beta protects against cardiac hypertrophy by blocking the Akt-dependent signalling pathway. *Basic research in cardiology* **108**, 338. (10.1007/s00395-013-0338-0) 査読有

**Sezaki, T., Inada, K., Sogabe, T., Kakuda, K., Tomiyama, L., Matsuno, Y., Ichikawa, T., Matsuo, M., Ueda, K. and**

**Kioka, N.** (2012). Role of Dlg5/lp-dlg, a membrane-associated guanylate kinase family protein, in epithelial-mesenchymal transition in LLC-PK1 renal epithelial cells. *PLOS One* **7**, e35519. (10.1371/journal.pone.0035519) 査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

2012.6.24-29 Noriyuki Kioka, Hiroshi Yamashita, Takafumi Ichikawa, Kazumitsu Ueda Interaction between vinculin and vinexin is involved in sensing ECM rigidity "Signaling by Adhesion Receptors" Gordon Conferences Waterville, ME, USA

2012.12.15-19 Hiroshi Yamashita, Ayaka Nagasato, Takafumi Ichikawa, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda and Noriyuki Kioka Vinexin-dependent distr Cell Biology San Francisco, CA, USA

2012.12.11-14 木岡紀幸 細胞外マトリックスの硬さの感知におけるピンキュリン-ピネキシン相互作用 第35回日本分子生物学会年会 福岡 ワークショップ

2013.3.15-17 Ayaka Nagasato, Hiroshi Yamashita, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka PIP2- dependent distribution of vinculin to lipid rafts stabilizes vinculin at focal adhesions The 14th International Membrane Research Forum 京都

2013.3.24-28 長里彩花、山下寛、市川尚文、松尾道憲、植田和光、木岡紀幸 接着斑タンパク質ピンキュリンの脂質ラフト局在化にはPIP2との相互作用が必要である 日本農芸化学会2013年度大会 仙台

2013.7.6 市川尚文、山下寛、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 細胞外マトリックスの硬さの感知におけるピンキュリン-ピネキシン 相互作用 第480回農芸化学会関西支部講演会 大阪

2013.8.7-9 木岡紀幸 細胞外マトリックスの硬さを感知するメカノセンサーとしての“接着斑” 理研シンポジウム「最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオラマン2017- 松山

2014.3.29 喜多真弘、市川尚文、瀬崎拓人、松尾道憲、植田和光、木岡紀幸 結合能と接着斑増強効果を指標としたピネキシンファミリー (Sorbs) タンパク質の機能の比較解析 日本農芸化学会2014年度大会東京  
他 21件

〔その他〕  
ホームページ等  
京都大学農学研究科  
応用生命科学専攻細胞生化学分野  
<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木岡 紀幸 (KIOKA, Noriyuki)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：90234179

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：