

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790250

研究課題名(和文) HGF-β鎖によるマクロファージ貪食促進作用の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of HGF-beta-induced macrophage phagocytosis

研究代表者

大西 浩之(OHNISHI, Hiroyuki)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90523316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：炎症・傷害の場におけるHGFのプロテアーゼ消化で生じたHGF-βは、Mφが発現するMRに結合し、アポトーシスに陥った好中球の貪食能を高めることが判明した。HGF-βはIQGAP1をリクルートすることが知られているMRに結合することでactinの再構成を起し、貪食促進活性を示している可能性が考えられる。HGF-β刺激によって、貪食に関わる細胞表面抗原の増加も認められた。今回の検討によって、HGF-β/MR系によるアポトーシス細胞の貪食促進を介した組織再生の可能性および炎症制御の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We provide evidence that hepatocyte growth factor (HGF) beta-chain remnant (HGF-beta), generated through fragmentation of HGF by proteases released from inflammatory cells such as neutrophils, potently stimulated phagocytosis of apoptotic neutrophils by binding to mannose receptor (MR), which recently identified as an HGF-beta receptor. Upon binding to MR, HGF-beta may modulate actin cytoskeleton and enhance phagocytosis through interaction between MR and actin-binding protein IQGAP1. HGF-beta also induced surface expression of CD11b, a component of receptor complex required for complement-mediated phagocytosis. These findings suggest that HGF-beta/MR axis-induced macrophage phagocytosis could prevent accumulation of apoptotic neutrophils and release of inflammatory molecules from neutrophils, which leads to resolution of inflammation and promotion of tissue repair.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：肝細胞増殖因子 マンノース受容体 マクロファージ 貪食作用

1. 研究開始当初の背景

傷害を受けた組織では、炎症反応として好中球プロテアーゼによる組織破壊やマクロファージ (Mφ) による不要物の貪食除去が行われる。炎症反応は組織傷害を増悪する一方で、組織再生の場を提供する生体防御反応といえる。組織の炎症と再生をつなぐプロセスを説明できる分子機構の解明は、炎症を集結させ組織再生をもたらす新薬開発の基盤となると考えられる。

HGF (Hepatocyte growth factor) は α 鎖と β 鎖から構成される増殖因子であり、c-Met 受容体に結合することで多彩な生理活性を發揮し、組織を再生へと導く。HGF は好中球などの炎症性細胞が分泌するプロテアーゼによって、 α 鎖および β 鎖 (HGF- β) に大きく断片化される。研究代表者は、HGF- β の受容体としてマンノース受容体 (Mannose Receptor, MR) を同定した。さらに、MR を発現するクッパー細胞 (組織在住 Mφ の一種) に HGF- β を作用させると、ラテックスビーズの貪食能が促進されることを見出した。

Mφ による貪食作用はアクチン細胞骨格、またエンドソーム、小胞体といった細胞内膜系の再構成を伴う細胞膜の動的変化である。貪食作用には貪食受容体 (貪食能を高める受容体、例えば補体受容体や Fc 受容体) を介したものと介していないものがあり、貪食される物質によって貪食様式も分子メカニズムも異なる。MR も貪食受容体のひとつであることが知られ、メカニズムは不明であるものの MR を介した病原体の貪食機構が知られている。

これまでの研究代表者の研究結果から、炎症・傷害組織における HGF 断片化と HGF- β 生成の可能性、また HGF- β /MR 系という独自の経路を介した組織修復機構が示唆された。しかしながら、HGF- β の貪食促進活性は炎症・傷害の場におけるどのような物質の除去に寄与するのか、またその分子メカニズムは未解明である。HGF- β による Mφ の貪食促進機構の解明は、炎症性疾患、免疫疾患や感染症において HGF- β /MR 系をターゲットとした創薬につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では生化学・細胞生物学的手法を用いて、HGF- β が MR を介して示す貪食促進作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そして、組織再生過程における HGF- β /MR 系の機能、ならびに炎症・傷害組織における HGF 断片化の意義を解明することにつなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 組換え HGF およびプロテアーゼ消化による HGF- β 作製と分離精製

組換え HGF をエラストラーゼで 5 時間処理し、ヘパリンアフィニティークロマトグラフ

イーおよびベンザミジンアフィニティークロマトグラフィーを用いて HGF- β を生化学的に精製した。

(2) HGF- β が促進する貪食粒子の特定

HGF- β で 16 時間刺激したクッパー細胞に、アポトーシスに陥った好中球およびネクロシスした Jurkat 細胞を貪食させ、1 時間後に貪食した Mφ の数を蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリー法で解析した。貪食させる死細胞は CFSE 等の蛍光色素であらかじめ標識しておき、貪食した Mφ を判別できるようにした。また、MR に対する siRNA を導入した Mφ に対する HGF- β の貪食促進活性についても解析を行った。

(3) アクチン再構成に対する HGF- β の作用についての解析

F-アクチンと MR の局在変化について

HGF- β でクッパー細胞を 16 時間刺激後、細胞を固定し F-アクチンと MR の免疫多重染色を行った。

アクチン重合阻害剤添加による貪食促進作用の変化

アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D 存在下で Mφ に HGF- β 刺激を行い、ラテックスビーズおよびアポトーシス好中球に対する貪食促進作用がキャンセルされるかどうかを解析した。

(4) MR と相互作用するシグナル伝達分子の同定

Mφ に HGF- β 刺激を行い、細胞溶解液を調製した。これに MR に対する抗体を添加し免疫沈降を行った。MR で免疫沈降されたタンパク質を電気泳動で分離し、IQGAP1 に対する抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

(5) HGF- β 刺激によって誘導される Mφ の表現型解析

Mφ に HGF- β 刺激を 24 時間行い、細胞表面抗原のひとつである CD11b の発現をフローサイトメトリー法によって、また MR の発現をウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) HGF- β の調製

HGF をエラストラーゼで消化し、液体クロマトグラフィーを用いて、本研究に十分な量の HGF- β を精製することができた。

(2) HGF- β /MR 系が貪食能を促進する粒子の特定

HGF- β によるラテックスビーズの貪食促進作用は、MR に対する siRNA の導入によって阻害された。従って、HGF- β は MR を介して Mφ の貪食能を促進していることが明らかとなった。

貪食メカニズムは被貪食粒子によって異

なり、MR を介した HGF- β の生物活性のメカニズム解明に重要なヒントを与えると考えた。そこで、HGF- β が M Φ に対して、どのような種類の粒子の貪食を促進するのかを解析した。

クッパー細胞を HGF- β で刺激した後、アポトーシスに陥らせたラット骨髄由来好中球（アポトーシス好中球）を添加して1時間貪食させた。そのところ HGF- β 刺激により、無刺激と比較して有意に多くのアポトーシス好中球の貪食が認められた（顕微鏡による細胞数カウント及びフローサイトメトリー）。アポトーシス好中球の貪食促進活性は、他の既知 MR リガンドである MUC-III、Thyroglobulin および Thyroid stimulating hormone では認められなかったことから、HGF- β 特異的な生物活性であることが判明した。また、ネクローシスに陥った Jurkat 細胞に対しての貪食作用については、HGF- β 刺激は影響を及ぼさなかった。以上の結果から、HGF- β /MR 系はアポトーシス好中球の貪食能に促進作用を及ぼす可能性が示された。

次に、HGF- β が貪食のための橋渡し分子（粒子と貪食細胞の双方に結合することによって貪食を補助する分子）である可能性について検討した。アポトーシス好中球と M Φ を共存させて貪食させる際、HGF- β を添加したが、アポトーシス好中球の貪食促進活性はほとんど促進されなかった。従って HGF- β は貪食の橋渡し分子としては作用しないことが考えられた。

(3) アクチン再構成に対する HGF- β の作用の可能性についての解析

F-アクチンと MR の局在

HGF- β 刺激したクッパー細胞では、無刺激の細胞と比較して F-アクチンと MR が共局在している像が観察された。このことから、HGF- β 刺激特異的にアクチン再構成が起こる可能性が明らかになった。次に、アクチンの再構成が HGF- β による貪食促進作用に必要であるかを検討した。

アクチン重合阻害剤添加による貪食促進作用の変化

サイトカラシン D 存在下でクッパー細胞を HGF- β 刺激し、ラテックスビーズおよびアポトーシス好中球の貪食を行わせた。無刺激のクッパー細胞の貪食能を阻害しない濃度で、サイトカラシン D は HGF- β による貪食促進活性をキャンセルした。このことから、HGF- β はアクチンの再構成を制御することで貪食作用を促進している可能性が示唆された。

(4) MR と相互作用するシグナル伝達分子の同定

以上の結果から、HGF- β は MR に結合し、アクチン再構成を介して貪食促進活性を示すこと、さらに HGF- β 刺激によって F-アク

チンを制御するタンパク質が MR にリクルートする可能性が考えられた。最近、MR と相互作用するタンパク質として IQGAP1 が報告されている (Yang S. et al., J Leukoc Biol. 93:529-536, 2013)。IQGAP1 は F-アクチンと相互作用し、アクチン再構成に関与していることが知られている。そこで、HGF- β 刺激した M Φ では MR と IQGAP1 が相互作用しているかどうかを免疫沈降による共沈実験で解析した。そのところ、HGF- β 刺激条件下においても MR と IQGAP1 の相互作用が確認された。同様に、免疫細胞化学的染色を用いても、MR と IQGAP1 の共局在が観察された。現在、IQGAP1 が HGF- β /MR 系による貪食促進活性のキー分子かどうかについて解析を進めている。

(5) HGF- β 刺激によって誘導される M Φ の表現型解析

HGF- β が M Φ の表現型に影響を及ぼし、貪食受容体の発現量を増加させている可能性について解析を行った。M Φ を HGF- β で 24 時間刺激したところ、細胞表面の CD11b の発現量が増加していることがフローサイトメトリー解析によって明らかとなった。一方で、MR の発現量については HGF- β 刺激による大きな変化は無かった (ウエスタンブロット法による結果)。CD11b は貪食受容体のひとつである補体受容体 (CR) のサブユニットであり、HGF- β によって CR を介した貪食が高められている可能性が示唆された。現在、補体で標識した粒子の貪食を HGF- β が高めるのかについて解析を進めている。

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2件)

1. Ikebuchi F, Oka K, Mizuno S, Fukuta K, Hayata D, Ohnishi H, Nakamura T. Dissociation of c-Met phosphotyrosine sites in human cells in response to mouse hepatocyte growth factor but not human hepatocyte growth factor: the possible roles of different amino acids in different species. Cell Biochem. Funct., 31: 298-304, 2013, 査読有
2. Ohnishi H, Oka K, Mizuno S, Nakamura T. Identification of mannose receptor as receptor for hepatocyte growth factor β -chain: novel ligand-receptor pathway for enhancing macrophage phagocytosis. J. Biol. Chem., 287: 13371-1381, 2012, 査読有

[学会発表](計3件)

1. 大西浩之: 炎症性プロテアーゼによる HGF 断片化で生じた HGF β 鎖の生物活性. 第 137 回薬学談話会, 2013.6.12, 名古屋市立大学 (愛知県)

2. 大西浩之、岡清正、水野信哉、中村敏一：
HGF β -chain 受容体としてのマンノース
レセプターの同定と新規食食促進機構の
可能性. 第 85 回日本生化学会大会、
2012.12.15、福岡国際会議場・マリンメッ
セ福岡（福岡県）
3. 大西浩之、岡清正、水野信哉、中村敏一：
HGF β -chain 受容体としてのマンノース
受容体の同定. 第 58 回日本薬学会東海支
部会、2012.7.7、静岡県立大学（静岡県）

〔図書〕(計 1 件)

1. Ohnishi H, Oka K, Mizuno S, Nakamura T.
Physiological Roles and Therapeutic
Implications of Hepatocyte Growth Factor
for Angiogenesis. In “Biochemical Basis and
Therapeutic Implications of Angiogenesis”,
Springer Science + Business Media New
York. 413-443, 2013, 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大西 浩之 (OHNISHI, Hiroyuki)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90523316

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し