

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790396

研究課題名(和文) Ly49Q介在性免疫応答とシャペロン介在性オートファジーとの時空間的クロストーク

研究課題名(英文) Spatio-temporal crosstalk between Ly49Q-mediated immune response and autophagy

研究代表者

田中 将志 (TANAKA, Masashi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：60381167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：炎症担当細胞にてサイトカイン産生等を制御する抑制性レセプターLy49Qと、細胞内ホメオスタシス維持を担うタンパク質分解系オートファジーとの関連を明らかにするため、Ly49Qノックアウトマウス由来の自然免疫系細胞や細胞株RAW264.7におけるLy49Q発現の陽性・陰性株を用いて解析した。オートファジー関連カテプシンの成熟型解析や炎症性刺激物に対するサイトカイン産生プロファイルの解析、分解小胞の細胞内局在解析等から、Ly49Qはオートファジー抑制や分解系オルガネラの輸送制御にも関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the relationship between Ly49Q, an inhibitory receptor expressed on inflammatory immune cells, and autophagy pathway which plays a significant roles for homeostasis, cellular response was analyzed using inflammatory immune cells from Ly49Q-knockout mice and RAW264.7 cell lines in which Ly49Q expression was high or low. On the basis of analyses of cathepsin-maturation involving in the autophagy, cytokine expression profiles in response to inflammatory stimuli, localization changes of endosomal/lysosomal organelles after inflammatory stimuli, it was suggested that Ly49Q involves in the inhibitory pathway for autophagy and the regulation of organelle-trafficking in inflammatory immune cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症

1. 研究開始当初の背景

細胞機能にとって重要な細胞内物質(タンパク質やオルガネラ等)のクオリティを保つには、適切な分解機構が働くことが重要である。特に飢餓や酸化ストレスで誘導されるオートファジー活性は、酸化ストレスで誘導される LAMP-2A 発現レベルと関連することも示唆されているが、オートファジーにおける LAMP-2A 動態の時空間制御機構は明らかでなく、またこの現象が炎症反応に果たす役割についても殆ど解析されていない。

Ly49Q はマクロファージ、樹状細胞、好中球に発現する抑制性レセプターである。細胞表面の脂質ラフトで MHCII 分子と会合し、炎症性刺激により細胞内にエンドサイトーシスされ、ライソソームと融合する。膜輸送の過程で、Ly49Q は、細胞質側にある ITIM モチーフに、チロシン脱リン酸化酵素である SHP1 や SHP2 を動員してそこからのシグナルを制御することで、炎症細胞の恒常性維持、組織浸潤やサイトカイン応答を制御している。さらに、Ly49Q はエンドソーム/ライソソームの脂質ラフトからのシグナルを制御すること、LPS レセプターである TLR4 は LPS 刺激により脂質ラフトへ移行すること、LAMP2A と複合体を形成して LAMP2A の機能をサポートするタンパク質 HSP70 も LPS 刺激により脂質ラフトに移行し TLR4 と会合してシグナリング複合体を形成することから、Ly49Q、TLR4、オートファジーの三者の間には機能的関連が強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、炎症担当細胞において組織浸潤やサイトカイン産生を制御する抑制性レセプター Ly49Q と、細胞内ホメオスタシス維持を担うタンパク質分解系であるオートファジーとの相互作用を明らかにすることで、Ly49Q に制御された炎症応答におけるオートファジーの役割を理解する。

3. 研究の方法

当グループが独自に作出した Ly49Q ノックアウトマウス由来のマクロファージ、樹状細胞に加え、マウスマクロファージ株

RAW264.7 における Ly49Q 発現の陽性株、陰性株を用い、Ly49Q 有無におけるオートファジー及びライソソームの性状、LAMP2A 発現への影響、Ly49Q による TLR4 シグナリング制御機構について、以下の解析を行う。

オートファジー活性との関連が示唆されるライソソームタンパク質 LAMP-2 の発現量の変動・状態について、Ly49Q の陽性・陰性細胞間で、ウエスタンブロットにより比較定量する。

オートファジー関連酵素であるカテプシンについて、Ly49Q の陽性・陰性細胞間で、成熟型の量の違いをウエスタンブロットにより比較解析する。

活性酸素産生関連酵素群の発現状態について、Ly49Q の陽性・陰性細胞間で、ウエスタンブロットにより比較定量する。

Ly49Q の陽性・陰性細胞を様々な炎症性刺激物質にて刺激した場合の炎症性・抗炎症性サイトカイン産生量について、フローサイトメーターや ELISA 法により定量し、炎症応答における違いを明らかにする。

Ly49Q の陽性・陰性細胞を様々な炎症性刺激物質にて刺激した場合のエンドソーム、ライソソームの状態(形態や細胞内局在)について、それぞれのオルガネラマーカー(EEA1、LAMP-1 等)による細胞内免疫組織染色を行い、比較解析する。

4. 研究成果

Ly49Q 有無におけるオートファジー関連タンパク質の発現量を解析した結果、次の結果を得た。

定常状態において Ly49Q 陰性マクロファージでは陽性マクロファージに比して LAMP-2A 発現量が高く、LAMP-2A の発現量はオートファジー活性と相関することから、Ly49Q 陰性マクロファージではオートファジー活性が亢進している可能性が示唆された。

オートファジー関連カテプシン(カテプシン

ン D 等) に関しても、Ly49Q 陰性マクロファージにおいて、成熟型の量が増大する傾向が見られ、Ly49Q 欠損によりオートファジー活性が上昇することが示唆された。

活性酸素産生に関わる酵素群の発現量の違いを解析し、さらに、炎症性刺激物である CpG オリゴヌクレオチド等に対する炎症性・抗炎症性サイトカインの産生プロファイルは、Ly49Q の有無で異なるだけでなく、当該刺激物と、エンドソーム、ライソソーム、オートファジー小胞それぞれとの共局在 kinetics や LAMP 輸送も影響を受けることを示唆する結果を得た。

以上、上記、 、 の結果に加え、LPS 刺激に対しても、Ly49Q 陰性マクロファージでは、炎症性サイトカイン産生能の低下(IL-6、MCP-1、TNF- α)やシグナル分子 p38 や Erk 等の LPS 刺激後のリン酸化の早期減弱を認めている。したがって、Ly49Q 欠損を起因としてオルガネラの輸送制御や恒常性維持機構が障害されるとともに、オートファジーの異常な高活性化が誘導され、その結果 TLR4 シグナリングが障害されることが示唆された。

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 3 件)

1. Selvam K, Duncan JR, Tanaka M, Battista JR.

DdrA, DdrD, and PprA: Components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1.

PLoS ONE. 2013. 8(7): e69007. (査読あり)

2. Tsuneyoshi Y, Tanaka M, Nagai T, Sunahara N, Matsuda T, Sonoda T, Ijiri K, Komiya S, Matsuyama T.

Functional folate receptor beta-expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles.

Scand J Rheumatol. 2012. 41(2): 132-140.

(査読あり)

3. Tanaka M, Nagai T, Usami M, Hasui K, Takao S, Matsuyama T.

Phenotypic and functional profiles of CR1g (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine.

Innate Immun. 2012. 18(2): 258-267. (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 将志 (TANAKA MASASHI)

国立国際医療研究センター・分子炎症制御
プロジェクト・特任研究員
研究者番号：60381167

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：