

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460595

研究課題名(和文) ANGPTLによる免疫グロブリン様受容体を介した免疫制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of immune regulation by Angptls through immunoglobulin-like receptors

研究代表者

海川 正人 (UMIKAWA, MASATO)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00325838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで私共はAngpt12が造血幹細胞の分化を阻害し体外増幅を促進する事を明らかにし、免疫グロブリン様受容体が関与する事を明らかにしてきた。近年Angpt12は慢性炎症の発生に重要な役割を果たしていることが報告されているが、どのような機構で炎症病態に関与しているか、ほとんど明らかになっていなかった。本研究によりAngpt12がマウス腹腔マクロファージ、単球を活性化し、NO合成酵素やプロスタグランジン合成酵素、IL-1、IL-6、TNF、CSF2などの様々な炎症性遺伝子の転写を劇的に増大させる事が明らかになり、炎症におけるAngpt12の新しい機能が示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Angpt12 inhibits differentiation and promotes ex vivo expansion of Hematopoietic stem cells via immunoglobulin like receptors. Although recent studies implicate Angpt12 in chronic inflammation, the mechanisms of inflammation caused by Angpt12 remain unclear.

In this study, we showed that Angpt12 directly activates resident murine peritoneal monocytes and macrophages and induces a drastic upregulation of the transcription of several inflammatory genes including nitric oxide synthase 2 and prostaglandin-endoperoxide synthase 2, and several proinflammatory cytokine genes such as interleukin (IL)-1, IL-6, TNF, and CSF2.

These results demonstrate a novel role for Angpt12 in inflammation via the direct activation of peritoneal monocytes and macrophages.

研究分野：生化学、免疫学

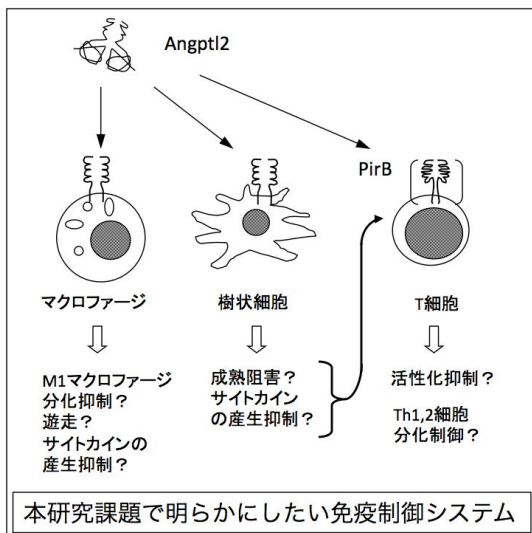
キーワード：Angpt12 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

免疫反応には生体内のマクロファージをはじめとし、T細胞、B細胞などの免疫細胞群が関係しており、免疫細胞の機能は様々な細胞内外のシグナル伝達分子によって調節されている。

Angiopoietin-like protein (Angptl) ファミリーは Angptl1~Angptl7 の7種類の蛋白質から構成され、血管新生促進因子 angiopoietin と高いアミノ酸配列相同性を示す分泌蛋白質群である。血管新生制御、脂質代謝やエネルギー代謝など幅広い生理作用を示す他、造血幹細胞の増殖因子としても働くことが分かっている。また、Angptl 蛋白質のうち Angptl2 は肥満の内臓脂肪組織で発現し、脂肪組織での炎症の発症、維持に関与していること、マクロファージの遊走能を亢進することが報告されている (Tabata et al. *Cell Metab.* 2009, 10:178-88)。しかしながら Angptl 蛋白質の受容体は不明であり、Angptl 蛋白質がどのような機構で免疫担当細胞への生理作用を発揮するかは、ほとんど明らかになっていなかった。

近年、造血幹細胞における Angptl2 の受容体が免疫グロブリン様受容体 LILRB2 であることが明らかになった (*Nature* 2012, 485: 656-660)。LILRB2 は免疫系の細胞に広く発現がみられる Leukocyte Immunoglobulin (Ig) -Like Receptor (LILR) ファミリーに属する膜蛋白質である。LILR ファミリー受容体は細胞外領域に複数の Ig 様ドメインを持ち、細胞内領域の構造から活性化型、抑制型、分泌型の3種類に分類される。LILRB2 は細胞内領域に SHP1 などのフォスファターゼを動員する ITIM ドメインを持つ抑制型の受容体であり、Angptl2 は造血幹細胞の LILRB2 に作用する事により、造血幹細胞の分化を抑制することで、幹細胞性を維持しながら増殖を促進すると考えられた。



2. 研究の目的

Angptl2 の受容体である LILRB2 は肥満細胞、

B細胞、好中球、マクロファージ、樹状細胞にも発現が確認される。また、そのマウスホモログ PirB は T細胞にも高発現しており、Angptl2 は LILRB2 (PirB) を介してそれら免疫細胞の分化や機能発現に関与していると考えられる。

そこで、本研究課題では、Angptl2 がその受容体である LILRB2 を発現する各種免疫細胞の分化や機能にどのような影響を与えるか解析するとともに、その分子機構の詳細を明らかにすることを目的とした。(図参照)

3. 研究の方法

まず、活性を持った Angptl2 蛋白質を研究に使用する為、

(1) Angptl2 を安定して産生する培養細胞株を樹立し、培養液中に分泌される Angptl2-flag 蛋白質を大量に精製する培養系を構築した。

次いで、Angptl2 の受容体を発現していると考えられる免疫細胞にどのような影響を与えるか、解析を行った。

[マクロファージに対する作用の解析]

(2) Angptl2 により走化性が亢進することが報告されている THP-1(ヒト単球細胞株)、および、生体由来のマウス腹腔マクロファージの Angptl2 に対する走化性を解析した。

(3) GM-CSF 存在下でマウスの骨髄細胞を7日間培養し M1 様マクロファージ・樹状細胞を分化誘導する (GM-BMDM)。また、M-CSF 存在下で骨髄細胞を7日間培養し M2 様マクロファージを分化誘導する (M-BMDM)。これらのマクロファージ様細胞の分化誘導に対して Angptl2 がどのような影響を与えるか解析した。

(4) THP-1細胞、マクロファージ様培養細胞株 RAW細胞と J774.1細胞、GM-BMDM、M-BMDM の LPS 刺激に対する反応 (IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインの産生) に Angptl2 が影響するか解析した。また、Angptl2 単独ではどのような影響を与えるか解析した。

(5) マウス腹腔マクロファージの LPS 刺激に対する反応 (IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインの産生) に Angptl2 が影響するか解析した。また、Angptl2 単独ではどのような影響を与えるか解析した。

4. 研究成果

(1) C 末端に Flag タグ配列を付加した Angptl2 遺伝子をコードするレトロウイルスを作成し、293T 培養細胞に感染させ、Angptl2 を安定して産生する培養細胞株を複数樹立した。Angptl2-Flag 蛋白質を培養液中に最も分泌する細胞株を選抜し、培養液中に分泌された修飾型の Angptl2-Flag 蛋白質を抗 Flag 抗体を用いて精製する系を確立した。得られた Angptl2-Flag はこれまで造血幹細胞の増幅実験に用いていた transient な強発現により得ていた Angptl2-Flag 蛋白質と同じ生化学的性質を示した。以上より、本研究

において 大量の修飾型 Angpt12 を安定して利用できるようになった。精製された Angpt12-Flag 蛋白質の分子量をゲル濾過 (Superdex G200) により測定を試みたところ、60kD の単量体は全く検出されず、700~750kD の画分に一部が溶出されたが、大部分は回収不能であった。回収された Angpt12 は少なくとも 12 量体を形成している事が示唆された。0.2M アルギニンを含むバッファー系では 700~750kD の画分の回収率がわずかに改善したが、大部分の Angpt12 は回収不能であった。

次いで、肥満細胞、B 細胞、T 細胞由来の細胞など PirB を発現しており、免疫学的実験に良く用いられる細胞を中心に Angpt12 に対する反応を解析したが、明らかな反応を見出す事はできなかった。

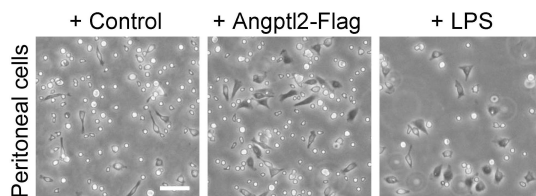
(2) Angpt12 により走化性が亢進することが報告されている THP-1 細胞をポイデンチャンバーの上部に入れ、下部を 0.1-1 μ g/ml の Angpt12-Flag を含む培地で満たし、24 時間後にフィルターを通過した細胞数を計測したところ、Angpt12 添加により細胞遊走に差異はみられなかった。既出の報告とは蛋白質の由来も濃度も異なるため、同一に扱う事はできないが、少なくとも本研究で使用している Angpt12 は THP1 の遊走を誘導しないことが明らかとなった。同様の方法でマウス腹腔細胞の Angpt12 に対する走化性を解析したが、移動する細胞数に有意な差は認められず、少なくとも Angpt12 は 0.1-1 μ g/ml の濃度では細胞遊走に影響しない事が明らかになった。

(3) Angpt12 存在下 GM-CSF 含有培地中でマウス骨髓細胞を 7 日間培養し M1 様マクロファージ・樹状細胞を分化誘導した (GM-BMDM)。また Angpt12 存在下 M-CSF 含有培地中で培養し M2 様マクロファージをそれぞれ分化誘導した (M-BMDM)。光学顕微鏡下の観察では細胞分化の過程で Angpt12 の添加による形態的な差異は GM-BMDM、M-BMDM ともに見られなかった。また、マクロファージのマーカーとして CD11b、CD11c、F4/80 を指標に FACS 解析したが、違いはみられなかった。さらに、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析でも細胞分化において Angpt12 添加による注目すべき差異は見出せなかった。以上のことから、Angpt12 はマクロファージ様細胞の分化に少なからず影響を与えない事が明らかとなった。

(4) THP-1 細胞、マクロファージ様培養細胞株 RAW 細胞と J774.1 細胞、GM-BMDM に Angpt12-Flag を加えたところ、形態的な変化は見られず、IL-6、IL-10、TNF α などのサイトカインの産生も見られなかった。また、LPS 刺激による形態変化、IL-6、IL-10、TNF α などのサイトカインの産生誘導に対しても Angpt12 は全く影響を与えず、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析でも注目すべき違いは見出せなかった。M-BMDM に対しても、形態的な変化は見られず、IL-6、IL-10、TNF α などのサイトカインの産生は見られなかった。しかし、抗 NF B 抗体を用いて細胞を染

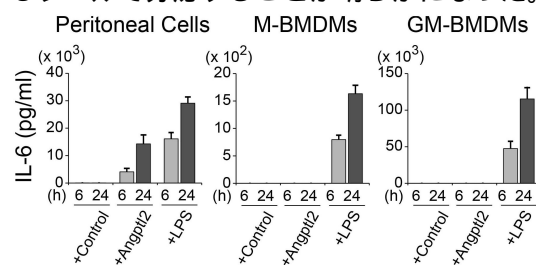
色したところ GM-BMDM では NF B は細胞質に存在していたが、M-BMDM では核移行し、活性化されることが明らかになった。NF B は活性化されているが、LPS 刺激のような炎症性サイトカインの産生がみられないことから、Angpt12-Flag は M2 様マクロファージ特異的に何らかの未知の作用を及ぼすと考えられる。

(5) マウス腹腔マクロファージが生理的な濃度の Angpt12 で活性化され、形態的な変化が起こる事を見出した。



Angpt12による腹腔マクロファージの形態変化

また、マウス腹腔マクロファージは Angpt12 刺激により、培地中に IL-6、IL-1 β 、TNF といった炎症性サイトカインを LPS で刺激と同じレベルで分泌することが明らかになった。



Angpt12による腹腔マクロファージの IL-6 産生

これまで Angpt12 の刺激により免疫担当細胞に蛋白質レベルで IL-6、TNF α といったサイトカインの産生が起こる事を示した報告はなく、Angpt12 の新たな生理的作用の一つと考えられる。また、炎症性サイトカインの遺伝子発現のレベルは Angpt12 処理 3 時間で顕著に増加していることから、Angpt12 直接の作用であると考えられた。

以上のように本研究で Angpt12 が腹腔マクロファージを直接活性化する事を示し、Angpt12 の免疫制御への関わり的一端を明らかにする事が出来た。

Angpt12 の受容体候補は免疫グロブリン様受容体を含め複数報告されているが、今後はこの活性化がどのような分子機構によるものか明らかにしていきたい。

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 1 件)

(1) Umikawa M, Umikawa A, Asato T, Takei K, Matsuzaki G, Kariya K, Zhang C. Angiopietin-like protein 2 induces

proinflammatory responses in peritoneal cells.

Biochem Biophys Res Commun.,
399(3):365-372, 2015, 査読有り

〔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

<http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/medicine-list/gsm-course/236.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海川 正人 (MASATO UMIKAWA)

琉球大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号：00325838

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：