

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750042

研究課題名(和文)ミトコンドリア病としての細網異形成症の分子機序の解明と新規栄養療法の考案

研究課題名(英文)Clarification of the molecular mechanism and development of novel nutritional therapy of reticular dysgenesis as mitochondrial disease

研究代表者

谷村 綾子 (TANIMURA, Ayako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：10610199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： エネルギー代謝関連酵素であるアデニル酸キナーゼ2(AK2)の欠損が、細胞異形成症における好中球分化障害を引き起こす機序について検討した。HL-60細胞を用いたマクロファージ分化・好中球分化の解析で、AK2およびミトコンドリア由来のATP供給が好中球分化に必須であり、AK2をノックダウンすることでROSの産生が上昇することを示した。また、分化中には分化系統特異的かつ時期特異的なUnfolded protein response(UPR)活性化が起こっており、これらが分化に必須であることも明らかにし、分子機序の一端を解明した。これらの成果は、新規治療標的の探索に重要なヒントを提示することになった。

研究成果の概要(英文)： Adenylate kinase 2 (AK2) is an energy-metabolic enzyme in mitochondrial intermembrane space. We studied about the mechanism of neutrophil differentiation arrest by AK2 deficiency in reticular dysgenesis. By analyzing macrophage and neutrophil differentiation using HL-60 cell line, we found that AK2 is essential for neutrophil differentiation and AK2 knockdown caused increased ROS production. Additionally, differentiation- and stage-specific activation of unfolded protein response (UPR) was observed during macrophage and neutrophil differentiation. We found that differentiation-specific UPR may be required for each differentiation. These results provided important hints to develop a new therapy for reticular dysgenesis.

研究分野：栄養学、生化学、細胞生物学

キーワード：AK2 ATP ROS UPR 好中球 細胞分化 細網異形成症 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

アデニル酸キナーゼ 2 (AK2)はミトコンドリア膜間での ATP、ADP、AMP 相互変換(ATP + AMP ⇌ 2ADP)により、ATP 合成の基質となる ADP のマトリックスへ、あるいは合成された ATP のミトコンドリア外への輸送に寄与しているエネルギー代謝関連酵素である(図1)。

2009年に、AK2 が好中球と T 細胞の欠損を示す免疫疾患、細網異形成症の原因遺伝子であることが報告された(Nat Genet. 2009)。しかしながら、エネルギー代謝関連酵素である AK2 の変異がどのようにして細網異形成症で見られる免疫細胞の欠損を引き起こすのかはいまだ不明である。

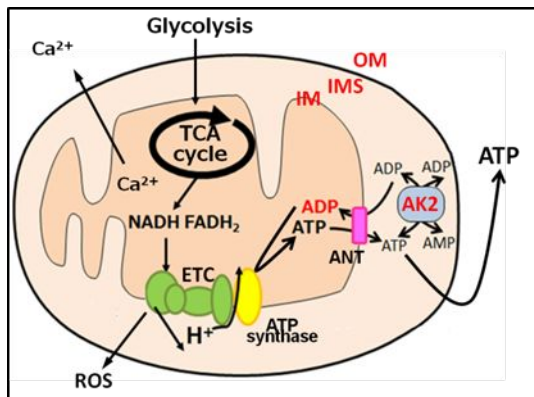


図 1. ミトコンドリアでのエネルギー合成と AK2

これまでに、当研究室では AK2 遺伝子変異がショウジョウバエで発生段階における致死性変化をおこすことを明らかにした(Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2009)。さらに、他の研究室から、AK2 ノックダウンにより B 細胞や脂肪細胞の分化が阻害されることが報告された(J Biol Chem. 2011)。このことから、AK2 の役割として単にエネルギー代謝のみならず、細胞分化へ関与していることが考えられた。

AK2 の血球系分化への影響を検討する前に、前段階として AK2 や類似酵素の各組織における発現を調べた。ミトコンドリア膜間には、クレアチンを用いて ATP、ADP の変換を行うミトコンドリアクレアチンキナーゼ(CKMT1、CKMT2)や、GTP を主に用いて NTP と NDP の変換を行うヌクレオシド二リン酸キナーゼ(NDPK-D)が存在している。つまり、AK2 以外にも、AK2 と同様の機能を持つ酵素が 3 種類あることになる。それぞれの mRNA、タンパク質発現をマウスで検討したところ、AK2 と CKMT1、2、NDPK-D は組織特異的発現が確認され、免疫造血系組織(脾、骨髄)では AK2 が優位に発現していた。以上の結果から、AK2 が血球分化時に存在する唯一の膜間酵素であることを見出した。

一方で、細網異形成症の根治療法としては造血幹細胞移植が主である。しかし、当然ながら適合するドナーを必要とするため、限ら

れた治療法であり、他の治療法の開発が必要と考えられる。細網異形成症はミトコンドリアにあるエネルギー代謝酵素の欠損により引き起こされるため、ミトコンドリア関連疾患の一つと考えることができる。ミトコンドリア病ではこれまでも栄養療法が行われている(表1)。

食品成分名	疾患名
CoQ10	リー症候群、 MELAS
イデベノン (CoQ10類似物質)	MELAS
ビタミンE	三頭酵素/ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素欠損症
リボフラビン	多種アシルCoA脱水素酵素欠損症、 電子伝達フラビン蛋白脱水素酵素変異
クレアチン	ミトコンドリア脳筋症
L-アルギニン	MELAS、 ミトコンドリア脳筋症
その他	葉酸、チアミン、L-カルニチン、ビタミンC、 -リボ酸、各種抗酸化物質

(Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002, Curr Treat Options Neurol 2009, N Eng Med 2012)

表 1. ミトコンドリア病の栄養療法例

しかし、臨床トライアルの報告はあるものの、生化学的・栄養学的分子基盤に基づいて食品成分での治療を行った検討はない。現状では、ミトコンドリアの複雑な代謝系ゆえに、単一の栄養素を大量補充しても簡単に代謝の働きを改善することは難しいと考えられており(難病情報センター www.nanbyou.or.jp/)、症状の改善には病態機序に基づく治療法が必要と考えられる。

2. 研究の目的

細網異形成症における好中球・T 細胞分化障害の機序をミトコンドリア機能との関連から明らかにするとともに、解明した発症機序に基づいた栄養学的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) AK2 欠損疾患モデル細胞の樹立
AK2 ノックダウン HL-60 細胞および AK2 ノックアウト HL-60 細胞を疾患モデル細胞として用いる。ノックダウンは AK2 siRNA を用いて Nucleofector II (Lonza) で導入した。ノックアウトは Zinc Finger Nuclease (Sigma) や CRISPR/Cas (Sigma, Life Technologies) による遺伝子の切断、あるいは single-strand oligo nucleotide (ssODN) を併用し、相同組み換えによる ATG の排除を目指した。

(2) マクロファージおよび好中球分化誘導
マクロファージ分化はホルボールミリスレートアセテート(PMA)20nM で 1 日処理することによって誘導した。一方、好中球分化は HL-60 細胞をオールトランスレチノイン酸

(ATRA)10 μ Mで4日処理し、誘導した(図2)。
 AK2 ノックダウン下で分化誘導を行う際は、AK2 のノックダウン効果が出る siRNA 処理後二日目に薬剤刺激を開始した。なお、分化誘導終了まで、ノックダウン効果が持続していることを確認している。

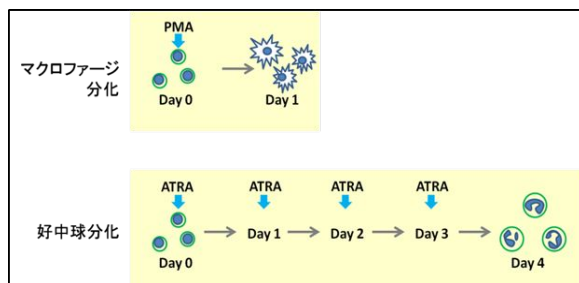


図 2. マクロファージ分化および好中球分化方法

(3) 分化マーカー、形態、機能活性測定による分化の確認

マクロファージ、好中球の分化マーカーとして、CD11b 発現を western blot で確認した。また、形態学的確認として、各分化後の細胞を Giemsa 染色および Wright-Giemsa 染色し、顕微鏡下で形態の変化、すなわちマクロファージは attach し、偽足を持つこと、好中球では核分葉が起こっていることを確認した。さらに、好中球機能の確認として NBT アッセイを行い、その陽性細胞をカウントして分化割合を算出した。ノックダウンの有無による分化への影響も同様の方法で比較した。

(4) ミトコンドリア関連測定

分化誘導中の酸化ストレス(ROS)、ATP 量の変動を調べた。ROS は CellROX Green Reagent (Life Technologies)で処理後、PBS で 2 度 wash し、マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。ATP 量は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)を用い、ルミノメーターで測定した後、製品説明書に従いタンパク量で補正した。

(5) 小胞体(ER)ストレスと unfolded protein response (UPR)の検出

ER ストレスおよび UPR 活性化については、それぞれのマーカーとなるタンパク質を Western blot で検出した。ER ストレスマーカーは BiP、UPR の 3 経路はそれぞれの下流、すなわち IRE1 では spliced XBP1、PERK では ATF4、ATF6 は cleaved form の ATF6 について発現変動を調べた(図3)。

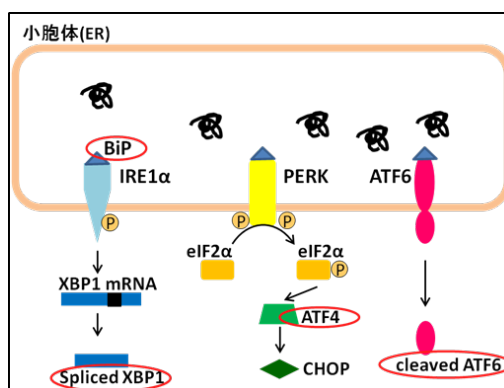


図 3. ER ストレス・UPR 経路と発現を確認したマーカー(赤丸)

(6) ATP 合成阻害による分化への影響

ミトコンドリアでの ATP 合成を阻害するため、ミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素に対する阻害剤 Oligomycin を用いた。処理初日は Oligomycin で 1 時間 pretreat 後、ATRA で誘導を行い、それ以降は ATRA と Oligomycin を同時に細胞に添加した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ・好中球分化時のミトコンドリア膜間酵素の発現変動

まず、AK2 や他のエネルギー代謝酵素と血球系細胞分化との関係について検討した。マクロファージおよび好中球へ分化可能な HL-60 細胞を用い、分化時の酵素発現を調べた。

その結果、分化誘導前の未分化な Myeloblast 様 HL-60 細胞では、他の酵素に比べ、AK2 が優位に発現していた。好中球分化では AK2 のみが発現していたが、マクロファージ分化では AK2 と CKMT1 が発現しており、分化細胞の系統による酵素の発現パターンの違いが観察された。したがって、好中球分化時には AK2 のみがミトコンドリア膜間でのアデニンヌクレオチドバランスの恒常性を担っており、マクロファージ分化では AK2 と CKMT1 の 2 つが担っていることが示された。このことから、マクロファージ・好中球ともに myeloid progenitor から分化する系統でありながら、細網異形成症患者において好中球分化にのみ特異的に障害が起こるのは、マクロファージには AK2 がなくとも CKMT1 がその役割を相補的に担うのに対して、好中球では AK2 欠損に伴って代替酵素がないためと考えられた。

(2) AK2 欠損がマクロファージ・好中球分化へ及ぼす影響の検討

さらなる検討のため、AK2 ノックダウンによる細網異形成症モデル HL-60 細胞を作製し、CD11b 発現および NBT assay により分化への影響を検討した。その結果、マクロファージ分化効率に変化しなかったが、好中球への分化効率は有意に減少した。

その際同時に、ミトコンドリア機能に関連

があると考えられる ROS、ATP 量についても検討した。結果、ATP 量はマクロファージ分化、好中球分化両方で AK2 ノックダウンにより低下し、分化 4 日目には ROS の有意な上昇が確認された。ATP 量、ROS の結果は(1)の結果とまとめて、PLoS One (9(2), e89916, 2014)で報告した。なお、この報告後、他の研究室から AK2 変異 iPS 細胞由来の血球細胞や zebrafish において、抗酸化物質により好中球分化が改善すること(J Exp Med. 2015)や、AK2 をノックダウンした HL-60 細胞でミトコンドリアでの酸化的リン酸化が阻害されていること(Cell Death Dis. 2015)が追って報告されている。

以上より、細網異形成症では AK2 欠損によるミトコンドリア膜間でのアデニンヌクレオチドの恒常性維持機構の破綻や、それに伴う ROS の上昇により好中球分化が障害されると考えられた(図 4)。

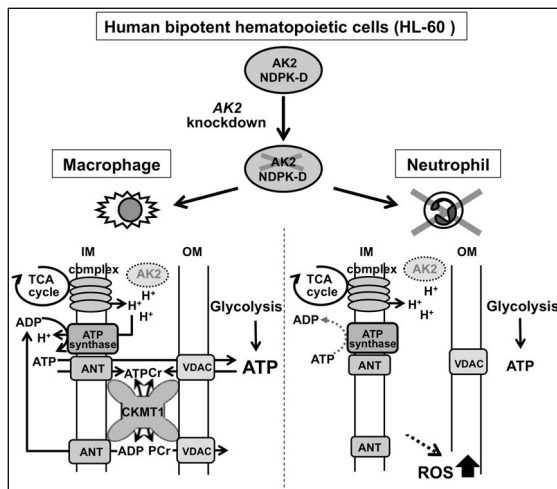


図 4. AK2 ノックダウン時のマクロファージ分化および好中球分化

(3) 好中球分化に対する UPR の影響

(2)で ROS や ATP 量の変動が明らかになったが、それだけでは好中球分化障害機序の説明は十分ではない。これまでに、AK2 ノックダウンが IRE1 の下流である XBP-1 の活性化低下を介した脂肪細胞株や B 細胞株の分化障害を引き起こすという報告がされ、ER ストレス、UPR と細胞分化との関連が考えられていることから(J Biol Chem. 2011)、ER ストレスと UPR に着目することにした。ER ストレスとは、小胞体に folding が異常なタンパク質が増加してきた際に細胞への障害等が起こることであり、その消去応答が UPR とされる。ER ストレス時には UPR 経路を抑制している BiP がそれぞれ分離し、シャペロンとして、folding 異常タンパク質の refolding を行う。一方、BiP が外れたことで活性化した UPR 経路のセンサー(IRE1、PERK、ATF6)はそれぞれの下流を活性化し、シャペロン合成を増加させることによるタンパク質の折りたたみの促進と、異常タンパク質の分解を行い、ER ストレスを改善する。

まず、血球分化時の ER ストレスの変動について検討したところ、マクロファージ、好中球のいずれの分化誘導前でも ER ストレスマーカー BiP は発現していたが、マクロファージ分化誘導 1 日後には BiP の発現がほとんど減弱した。一方、好中球分化では分化が完了する 4 日目にかけて BiP の発現が経時的に減少した。そこで、ER ストレスの改善に関わる UPR の各分化中の変動を確認した結果、マクロファージ分化において、ATF6 の活性化を示す cleaved ATF6 の発現を検出した。一方、好中球分化では分化初期に PERK の活性化を示す ATF4、また分化時期全般で cleaved ATF6 の発現が見られ、さらに分化後期には IRE1 の活性化を示す spliced XBP1 の発現を検出した。また、UPR 阻害剤を用いて各分化への影響を確認したところ、マクロファージ分化は ATF6 阻害剤で、好中球分化は ATF6、PERK、IRE1 の阻害剤で抑制されることがわかった。このことから、分化系統特異的、また時期特異的な UPR 経路が起こっており、また、それらが分化に必須であることが示された。

(4) ミトコンドリア ATP 合成阻害による好中球分化への影響

次に、ミトコンドリア由来の ATP の好中球分化への影響を確認するため、Oligomycin を用いて、ミトコンドリアからの ATP 供給を阻害し、好中球分化への影響を検討した。Oligomycin は濃度依存的に細胞内の ATP 量を低下させており、その際、好中球分化が著明に阻害されることが示された。このことから、ミトコンドリアでの ATP 合成は好中球分化に必要であることが示唆された。

(2)、(3)に記載した結果とあわせると、AK2 欠損時にはマクロファージ分化および好中球分化両方で ATP 量の低下が起こるが、好中球分化で特異的に見られた PERK、IRE1 に関しては、ATF6 と異なり、活性化に ATP が必要であるとされており、好中球分化時には AK2 の欠損によりミトコンドリアからの ATP 供給が低下することで UPR が障害され、分化異常を引き起こす可能性が示された(図 5)。(投稿準備中)

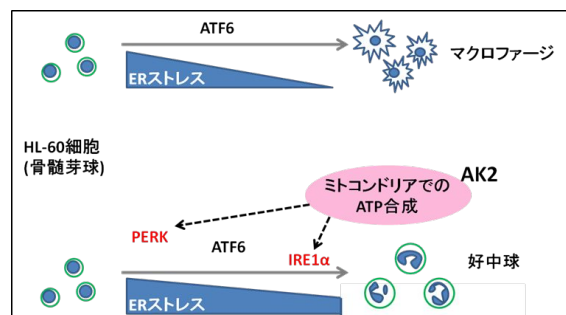


図 5. マクロファージ分化および好中球分化時の ER ストレス・UPR の変動と、AK2・ATP との関連

(5) 他のエネルギー代謝関連酵素による rescue の計画

病態機序検討および治療法の開発のため、AK2 ノックアウト HL-60 株を用いた、他のエネルギー代謝関連酵素による rescue を計画し、研究を進めた。まず、ゲノム編集技術(ZFN、CRISPR/Cas)を用いて AK2 ノックアウトモデル細胞の作製を試みた。しかしながら、AK2 偽遺伝子の存在や血球細胞ゆえの遺伝子導入効率の低さ・ダメージへの脆弱さのため、現時点で成功していないことから現在もモデル細胞の作製を挑戦中である。

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. Tanimura A, Horiguchi T, Miyoshi K, Hagita H, Noma T. Differential expression of adenine nucleotide converting enzymes in mitochondrial intermembrane space: a potential role of adenylate kinase isozyme 2 in neutrophil differentiation. PLoS ONE. 査読有, 9, 2014, e89916, DOI: 10.1371/journal.pone.0089916.

2. Horiguchi T, Fuka M, Fujisawa K, Tanimura A, Miyoshi K, Murakami R, Noma T. Adenylate kinase 2 deficiency limits survival and regulates various genes during larval stages of *Drosophila melanogaster*. J Med Invest. 査読有, 61(1-2), 2014, 137-50. DOI:10.2152/jmi.61.137.

[学会発表](計 5 件)

1. 谷村 綾子 他. HL-60 細胞を用いた血球分化時における Unfolded protein response の解析. 第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会. 2016年5月28日. 高知大学 医学部, 高知市, 高知県.

2. Tanimura A. Adenylate Kinase 2 Regulates Neutrophil Differentiation Via Mitochondrial function. The 3rd ASEAN Plus and Tokushima Joint International Conference (Invited). 2014年12月5日. Imperial Aryaduta Hotel, Makassar, Indonesia.

3. Tanimura A et al. A role of adenine nucleotide converting enzymes in the mitochondrial intermembrane space on the hematopoietic cell differentiation. Keystone Symposia The Chemistry and Biology of Cell Death (Q6) joint with the meeting on Mitochondrial Dynamics and Physiology (Q5). 2014年2月21日, Santa Fe

Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico, USA.

4. Horiguchi T, Tanimura A et al. A Role of AK2 during Development of *Drosophila melanogaster*. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria. 2013年10月29日. Okinawa Zampamisaki Royal Hotel, 読谷村, 沖縄県.

5. 谷村 綾子 他. アデニル酸キナーゼ 2 の血球系分化への影響. 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会. 2013年5月31日. 徳島大学 大塚講堂, 徳島市, 徳島県.

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷村 綾子 (TANIMURA, Ayako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 10610199