

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860322

研究課題名(和文)マクロファージにおける細胞死制御機構とその生理的意義

研究課題名(英文)A novel regulatory mechanism of cell death in macrophages

研究代表者

高江洲 義一 (TAKAESU, Giichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60403995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌感染によって活性化したマクロファージはしばしば細胞死を起こす。マクロファージの細胞死は病原体と宿主の両方によって複雑に制御されており、細胞死が宿主にとって有益となるか害となるかは、感染した病原体の種類や状況によって異なる。未だ不明な点の多いマクロファージの細胞死制御機構を詳細に理解することは、感染症や敗血症の新規治療法開発に役立つ。本研究では独自の切り口でその解明に取り組み、アダプタータンパク質TAB2が、グラム陰性細菌の細胞壁成分LPSを認識したマクロファージの過剰な活性化を抑えるために必須の役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macrophages often undergo programmed cell death upon microbial infection. Macrophage cell death is positively or negatively regulated by both host and pathogens, which can be beneficial or detrimental to the host depending on the type of pathogens. Currently, it is not fully understood how this programmed cell death is regulated. In this study, I have investigated the roles of TAK1 and its binding protein TAB2 in the control of macrophage cell death. I found that TAK1, but not TAB2, is essential for naive macrophage survival in vitro. Tab2-deficient macrophages underwent cell death when they were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), as well as with other TLR ligands including Pam3CSK4, poly I:C or CpG DNA. Moreover, macrophage-specific conditional Tab2 knockout mice were more susceptible to LPS-induced septic shock than wild-type mice. These results may indicate that TAB2 is essential for preventing hyper activation of macrophages in response to LPS in vitro and in vivo.

研究分野：自然免疫

キーワード：マクロファージ 細胞死

1. 研究開始当初の背景

長らくプログラム細胞死といえばアポトーシスとほぼ同義であったが、これまで受動的・突発的な細胞死と考えられてきたネクロトーシスにも、遺伝子によって制御されるプログラム細胞死と呼べる様態があることが最近明らかになった。プログラムネクロトーシスの重要な生理的役割の一つは、感染応答におけるアポトーシス不全の際のバックアップシステムとして機能し、感染局所で炎症を誘導することと考えられている。感染初期の生体防御においては、病原体を貪食したマクロファージによる、殺菌、サイトカイン/ケモカインの産生、獲得免疫の誘導、が重要な役割を果たす。一方、細菌やウイルスの中には、マクロファージのアポトーシスを誘導して宿主の免疫に対抗するものや、逆にマクロファージのアポトーシスを抑制しつつその細胞内で増殖するものもある。これに対して、マクロファージ自身は Ripk1/Ripk3 依存的なネクロトーシスや Caspase-1 依存的なパイロトーシスという炎症誘導性のプログラム細胞死を惹起して細胞内寄生菌の増殖に抵抗する。このように感染に伴うマクロファージの細胞死は病原体と宿主の両方によって複雑に制御されており、細胞死の促進/抑制がどちらにとって有益となるかは、感染した病原体の種類によって異なる。マクロファージの細胞死制御機構を詳細に理解し、状況に応じて適切に制御することができれば、感染症などの治療に役立つと期待される。

Transforming growth factor- β -activated kinase 1(TAK1)は、TGF- β によって活性化されるほ乳動物の MAPKK キナーゼ(MAPKKK)ファミリーの一つとして最初に報告され、その後の解析により、TGF- β 以外にも炎症性サイトカインの Interleukin-1 β (IL-1 β)や Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、細菌成分 Lipopolysaccharide (LPS)、高浸透圧ストレスなど、さまざまな刺激によって活性化されることが明らかとなった。In vivo では、TAK1 は胚形成に必須であるほか、リンパ球の分化・生存・活性化、繊維芽細胞やケラチノサイトにおける細胞死の抑制、造血幹/前駆細胞の生存維持にも必須の役割を果たす (Sato et al., Nat Immun. 2005; Wan et al., Nat Immun. 2006; Schuman et al., Blood 2009; Omori et al., JBC, 2008; Tang et al., JEM, 2008)。研究代表者はこれまでに、IL-1 β や TNF- α 刺激による転写因子 NF- κ B の活性化に TAK1 が必須の役割を果たすことを明らかにし (Takaesu et al., J. Mol. Biol., 2003)、さらに、これらのサイトカインによる TAK1 の活性化に関与するアダプター分子 TAK1-binding proteins 2 (TAB2) を同定、その作用機序の解析を行ってきた (Takaesu et al., Mol Cell, 2000; Takaesu et al., Mol Cell Biol, 2001)。また、TAB2 がオートファジー制御因子の一つである Beclin1 とも直接結合

でき、培養細胞系において TAK1 非依存的に基底レベルのオートファジーを抑制することを報告した (Takaesu et al., J. Biochem, 2011)。一方で、TAB2 の in vivo での役割については、胚発生に必須であることが明らかになっているものの (Sanjo et al., MCB, 2003)、成体の各組織における役割については研究が進んでいない。腸管病原性大腸菌 (EPEC) のエフェクター分子 *NleE* が TAB2 タンパク質をメチル化して NF- κ B の活性化を阻害するという報告 (Zhang et al., Nature, 2012) もあることから、TAB2 がマクロファージなどの自然免疫担当細胞の細菌感染応答に関与する可能性も十分考えられる。

そこで、マクロファージにおける TAB2 の役割を明らかにするため、貪食細胞特異的コンディショナルノックアウトマウス (*Tab2-mk0*、詳細は 3. 研究の方法に記載) を作製した。このマウスから骨髄由来マクロファージ (BMDM) を分離・培養し、LPS で刺激したところ、刺激後 16 時間程度で細胞が死ぬことを見いだした (未発表データ)。過去に、p38 または NF- κ B のいずれかの活性が LPS で刺激した BMDM の生存に必須であることが報告されているが (Park et al., Immunity, 2005) これまでの予備的知見から、*Tab2-mk0* BMDM における LPS 誘導性の細胞死には p38, NF- κ B とは別の機構が働いていることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、TAB2 による活性化 $M\phi$ のプログラム細胞死制御機構とその意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

培地: RPMI1640 培地 (SIGMA, R8758) に次のものを加えてマクロファージ分化誘導培地 (L929-conditioned medium, LCM) とした。L929 細胞培養上清 (30% v/v)、ウシ胎児血清 (10% v/v)、ペニシリン・ストレプトマイシン。細菌感染実験では、抗生剤不含 DMEM (SIGMA, D5796) を用いた。

貪食細胞特異的 TAB2 欠損 (*Tab2-mk0*) マウスの作製: *LysM-Cre* トランスジェニックマウスと *Tab2-flox* マウスを交配させることにより、*LysM-Cre Tab2-flox/flox* マウスを得、これを *Tab2-mk0* マウスとして実験に用いた。No Cre コントロールとして *Tab2-flox/flox* マウスを、ヘテロコントロールとして *LysM-Cre Tab2-flox/+* マウスを用いた。

骨髄由来マクロファージ (BMDM) の調製: 6-12 週齢マウスの脛骨及び大腿骨から骨髄細胞を採取し、LCM 培地で 6-7 日間培養することで BMDM を得た。

細胞生存率の判定: 細胞を 4% パラホルムアルデヒド/PBS (-) で固定した後、0.1% クリスタルバイオレット (CV) で染色し、0.1M クエン酸ナトリウム/50% エタノール溶液で CV を抽出した。CV 抽出液の吸光度 (波長 595nm) を

測定し、細胞生存率を求めた。また、CellTiter-Glo キット (プロメガ社) を用いて細胞内の ATP 量を定量的に測定し、その値に基づいた細胞生存率も求めた。

アポトーシスとネクローシスの判定: 細胞を Annexin V と Fixable Viability Dye eFlour 780 (eBioscience 社) による二重染色後、フローサイトメーター (EC800、ソニー社) を使って解析した。

サイトカイン濃度の測定: マウス用 ELISA キットを用いて、培養上清中およびマウス血清中の IL-1 β (eBioscience 社)、TNF- α 、IL-6 (BioLegend 社) の濃度を測定した。

4. 研究成果

まず、*Tab2-mk0* M ϕ における刺激誘導性の細胞死が LPS 刺激に特異的かどうかを調べた。その結果、poly I:C, CpG DNA, Pam3CSK4 などの他の TLR リガンドで *Tab2-mk0* M ϕ を刺激した場合にも細胞の生存率低下は認められたものの、LPS に比べるとその効果は限定的であった。また、NOD1, NOD2 に対する合成リガンドである iE-DAP, MDP 刺激では *Tab2-mk0* M ϕ の細胞死は全く誘導されなかった (図 1)。以上の結果から、*Tab2-mk0* M ϕ では、MyD88 と TRIF に依存する両方の経路が細胞死の誘導に寄与している可能性が考えられる。

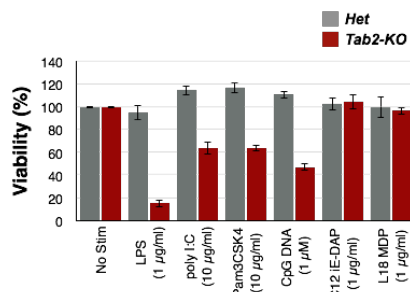


図 1 TAB2 は LPS 刺激後の M ϕ の生存に必須である。野生型 (Het) または *Tab2* 欠損 (*Tab2-KO*) M ϕ を各種 TLR または NLR リガンドで 24 時間刺激し、細胞の生存率を CV 染色法で調べた。(平均値 \pm S.D., n=3)

次に、LPS 刺激に焦点を絞って、*Tab2-mk0* M ϕ における刺激誘導性の細胞死がカスパーゼ 1, 3, 8 または RIPK1, 3 に依存するかどうか、それぞれに対する特異的阻害剤を用いて調べた。その結果、RIPK1 阻害剤である Necrostatin-1 (Nec-1) で細胞を前処理した場合にのみ生存率の一部回復が認められた (図 2)。したがって、*Tab2-mk0* M ϕ における LPS 誘導性の細胞死はネクロプトーシスの可能性が高い。しかし、Nec-1 の効果が限定的であったことから、アポトーシスやパイロプトーシスなど他の細胞死制御機構も同時に働いている可能性も考えられる。これについては、今後、複数の阻害剤を組み合わせた同時投与実験を行って検証する。

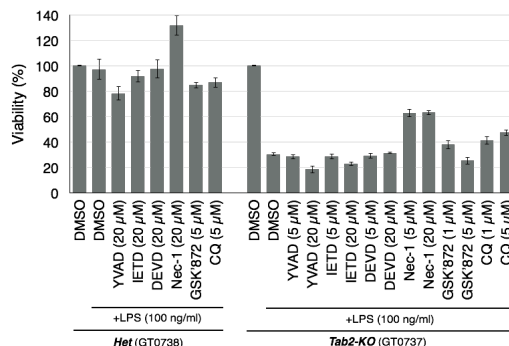


図 2 *Tab2* 欠損 M ϕ における LPS 誘導性細胞死は一部 RIPK1 依存的である。野生型 (Het) または *Tab2* 欠損 (*Tab2-KO*) M ϕ を各種阻害剤の存在下で LPS 刺激し、24 時間後の細胞生存率を CV 染色法で調べた。(平均値 \pm S.D., n=3)

さらに、*Tab2-mk0* M ϕ を LPS で刺激した際にどの分子が活性化しているのかをウエスタンブロット法で調べた。その結果、カスパーゼ 1, 11, 8 の活性化が認められた。興味深いことに、この時の培養上清からは、成熟型 IL-1 β および IL-18 も検出された (図 3)。このことから、*Tab2-mk0* M ϕ では、LPS 刺激単独でインフラマソームの活性化が起きている可能性が示唆される。RIPK1, RIPK3 については、今後、それぞれ切断産物やリン酸化を指標にして、活性検出を試みる。

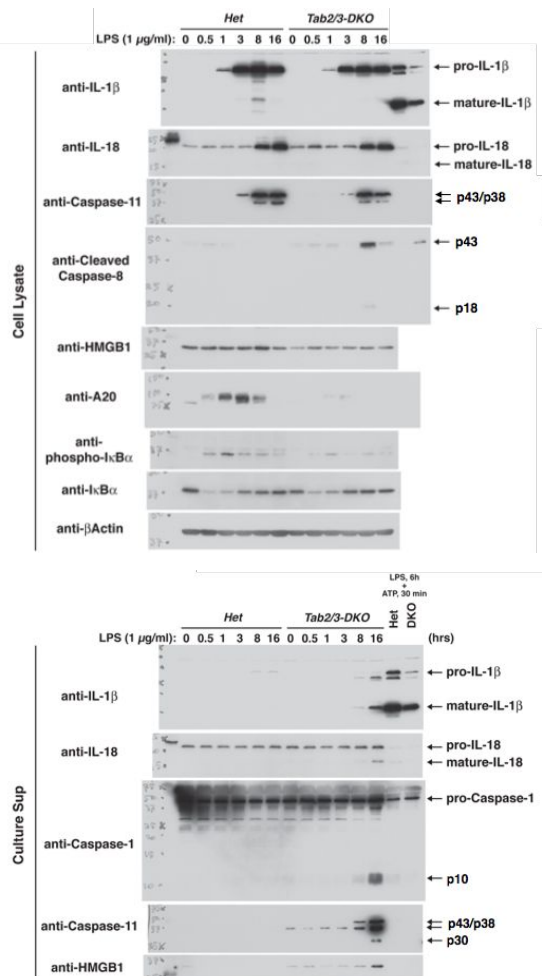


図3 *Tab2* 欠損 $M\phi$ は LPS 刺激に反応して IL-1 β 、IL-18 を産生する。野生型 (Het) または *Tab2* 欠損 (*Tab2-KO*) $M\phi$ を LPS で刺激し、細胞抽出液 (Cell Lysate) および培養上清 (Culture Sup) を図に示した抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。

Tab2-mKO $M\phi$ が特に LPS に強く反応して細胞死を起こすことから、次にグラム陰性細菌の感染における TAB2 の役割を調べた。菌種は腸管病原性大腸菌 (EPEC) および非病原性大腸菌 K-12 由来株 (DH5 α) を用いた。EPEC または DH5 α を MOI 0.1 で BMDM に感染させ、9 時間後の細胞生存率を測定したところ、EPEC 感染細胞では生存率が約 40% 低下していたのに対し、DH5 α 感染細胞では有意な差は認められなかった (図 4)。3 型分泌装置欠損株 (EPEC Δ escN) を感染させた場合にも、*Tab2-mKO* $M\phi$ の生存率は野生株と同程度に低下したことから、3 型分泌装置に依存しない何らかの要因で細胞死が誘導されていると考えられる (data not shown)。

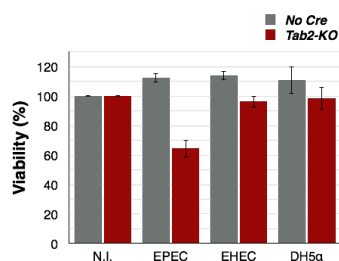


図4 TAB2はEPEC感染後の $M\phi$ の生存に必須である。野生型 (No Cre) または *Tab2* 欠損 (*Tab2-KO*) $M\phi$ に EPEC または DH5 α を MOI 0.1 で感染させ、9 時間後の細胞生存率を CV 染色法で調べた。(平均値 \pm S.D., n=3)

最後に、敗血症における TAB2 の役割を調べた。8-9 週齢の野生型および *Tab2-mKO* マウス各 3 匹に対し、5 mg/kg の LPS を腹腔内投与し、12 時間毎の生存率を調べたところ、*Tab2-mKO* マウスは 3 匹中 2 匹が 12 時間以内に死亡した (図 5)。これらのマウスの血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α の濃度を ELISA 法で測定した結果、いずれのサイトカインも *Tab2-mKO* マウスの方で血中濃度が上昇していた (一部、data not shown)。今後、マウスの数を増やして、有意差の有無を確認する。

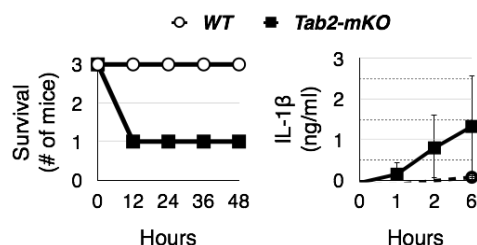


図5 *Tab2-mKO* マウスは LPS による敗血症ショックに感受性である。野生型 (WT) または *Tab2* 欠損 (*Tab2-mKO*) マウスの腹腔内に LPS (5 mg/kg) を注射投与し、12 時間毎の生存率 (左) および 1, 2, 6 時間後の血中 IL-1 β の濃度を調べた。(平均値 \pm S.D., 各 n=3)

以上より、TAB2 が LPS 刺激による過剰な $M\phi$ の活性化を防ぐ役割を果たしていることを、in vitro, in vivo の両面から明らかにすることができた。今後、インフラマソームの構成因子 (NLRP3, ASC, カスパーゼ 1) の遺伝子欠損マウスを用いて、TAB2 による IL-1 β 成熟制御に関わる分子を同定するとともに、TAB2 による炎症抑制作用が TAK1 に依存するかどうかを明らかにする予定である。

近年、慢性炎症が、肥満、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病や神経変性疾患、がんなど多くの疾患の基盤病態であることが分かってきた。しかし、なぜ炎症反応が慢性化するのをはじめ、慢性炎症の実体には不明な点が多い。慢性炎症の原因の一つに IL-1 β の過剰産生が挙げられる。また、慢性炎症を引き起こす多くの内因性リガンドが LPS 受容体の TLR4 を活性化することが知られている。これらのことから、本研究で得られた知見は、細菌感染時の急性炎症のみならず、さまざまな慢性炎症性疾患の新規治療法の開発基盤として役立つと期待される。

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 2 件)

- Mihaly SR, Morioka S, Ninomiya-Tsuji J, Takaesu G. Activated Macrophage Survival Is Coordinated by TAK1 Binding Proteins. *PLOS ONE*. 2014 Apr 15;9(4):e94982. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0094982.
PubMed PMID: 24736749
- Morioka S, Broglie P, Omori E, Ikeda Y, Takaesu G, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation. *J Cell Biol*. 2014 Feb 17;204(4):607-23. 査読有
doi:10.1083/jcb.201305070.
PubMed PMID: 24535827

(学会発表)(計 1 件)

- Mihaly SR, Morioka S, Suzuki T, Ninomiya-Tsuji J, Takaesu G. TAK1 kinase complex regulates macrophage survival. Keystone symposium, "The Chemistry and Biology of Cell Death" Feb. 2014, Santa Fe, New Mexico, USA

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/bacteriology/welcome/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

高江洲 義一 (TAKAESU, Giichi)

琉球大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：60403995

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし