

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462756

研究課題名(和文) 組織損傷時に放出される細胞内タンパク質群の“細胞外機能”と単球表面への結合機序

研究課題名(英文) Extracellular function of intracellular proteins released from damaged tissue and bound to monocytes.

研究代表者

泉 友則 (IZUMI, Tomonori)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00261694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：組織損傷にともない、様々な細胞内タンパク質が漏出するが、細胞外での機能的影響の多くは不明である。急性期の炎症における役割を明らかにするために、これまでに同定した単球表面結合能を有する細胞内タンパク質について、細胞影響を解析し、その受容体を探索した。潜在的機能分子のひとつは、U937細胞培養系への添加によりMAPキナーゼカスケードのリン酸化を増強した。プロテオーム解析により同定された潜在的機能分子の受容体は、接着・運動に関わる細胞膜タンパク質であった。これらの結果は、漏出した細胞内タンパク質が、損傷部位へ単球が集積し、細胞断片を除去する過程において重要な役割を果たしている可能性を示している。

研究成果の概要(英文)： While various intracellular proteins are released from damaged tissue, their functional influence in the extracellular space remains largely unknown. To elucidate the role of released proteins in the acute inflammatory response, intracellular proteins showing binding activity to monocytes were examined for their functions and corresponding receptors. A certain intracellular protein was found to enhance phosphorylation of a MAP kinase cascade. Furthermore, the receptor identified by proteomic approach was a plasma membrane protein involved in cell adhesion and motility. These results indicated that the released intracellular protein might play important roles in accumulation of monocytes at the site of injury and removal of fragments of damaged cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：機能プロテオーム解析 細胞表面標識 細胞質漏出 炎症メディエーター 疾患マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 細胞内タンパク質の細胞外への漏出と病態

シグナル配列を持つ典型的な分泌タンパク質は小胞体-ゴルジ体を経由して積極的に細胞外へ輸送されるのに対して、細胞内に局在するタンパク質は細胞膜の損傷にともなって、あるいは特殊な細胞内小胞を介した新しいタイプの分泌機序により放出される。例えばいくつかの中樞神経特異的なタンパク質 (NSE, GFAP, S-100B など) の体液中の濃度上昇は中樞神経組織障害の程度と相関し、蘇生後脳症のバイオマーカーとして利用されている。一方、DNA 結合タンパク質である high mobility group box-1 (HMGB1) は、広汎な発現分布とは対照的に、近年、敗血症などの急性期病態を悪化させる炎症メディエーターとして、機能的に注目されている。このような、病態と相関し、放出されるタンパク質には、組織障害の結果であると同時に、病態悪化の原因、あるいは逆に、生理的な防御・修復機能が想定されるが、大多数の異所性の細胞内タンパク質については、その分子機能の病態への影響は見過ごされている。

### (2) 疾患プロテオーム解析研究からの示唆

われわれは、これまで中樞神経障害を中心とした救急領域のバイオマーカー探索と病態機序解明を目指して、独自の高性能解析技術を利用した網羅的タンパク質解析を進めてきた。蘇生後脳症患者脳脊髄液より同定されたタンパク質のうち、3割以上を細胞内タンパク質が占め、それらの中には予後の悪化に伴い増加する一群のタンパク質が含まれていた。また、新しい蘇生後脳症予後判定マーカーのひとつは、予後を左右する機能的な重要性も想定されている。

### (3) 細胞内タンパク質の細胞外での機能を解き明かす方法論

これまでに患者体液中から同定した細胞内タンパク質は、ヒストンやリボソームタンパク質などの核タンパク質、アクチンなどの構造タンパク質、種々の代謝系酵素やインヒビターなど、それらの活性は多岐にわたり、網羅的な機能解析は困難である。そこで、「異所性タンパク質の細胞影響は細胞表面への結合を介する」と仮定し、われわれが開発した細胞表面標識と大規模タンパク質解析システムを組み合わせたプロテオーム解析技術により網羅的探索を行った。

### (4) U937 細胞表面結合能を有する 168 種類の潜在的機能分子

損傷線維芽細胞からの放出タンパク質 (580 種類) と単球系細胞株 U937 細胞表面への結合タンパク質 (454 種類) を個別に同定し、最終的に「損傷細胞から放出され、単球表面に結合する 168 種類の潜在的機能分子」を特定した。これらの潜在的機能分子には

HMGB1 などの既知の炎症メディエーターや各種組織損傷マーカーに加え、急性期の患者体液で見出される細胞内ハウスキーピングタンパク質も多数含まれており、細胞表面への結合能を持つこれら一群の細胞内タンパク質が、組織損傷時の生理的な防御・修復過程に積極的に関与している可能性が強く示唆された。

以上のことから、本研究では急性期病態のひとつである炎症に注目し、これまでに特定した潜在的機能分子について、単球系培養細胞の細胞内シグナリングやサイトカイン産生への影響を調査するとともに、細胞表面への結合機序を解析することとした。

## 2. 研究の目的

組織損傷時に放出される細胞内タンパク質群の炎症反応における機能的な意義を明らかにするためには「どのタンパク質が、いかにして細胞表面に結合し、どのような炎症応答に影響を与えるか?」という問題を明らかにする必要がある。そこで、主要な潜在的機能分子を精製タンパク質、あるいは組換えタンパク質として単球系細胞株に添加した時の細胞内シグナルの変化やサイトカイン産生への影響を解析し、炎症関連分子を特定する。さらに、組織損傷・修復過程への密接な関与が推定される潜在的機能分子について、細胞膜上の相互作用分子 (受容体) をプロテオーム解析技術により同定し、細胞影響の分子経路を明らかにする。組織の損傷・修復という観点から、潜在的機能分子の新たな役割を明らかにするとともに、急性期病態における新しい治療ターゲットの提示を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 潜在的機能分子の選択とタンパク質調製

これまでにプロテオーム解析で同定した単球表面結合能を有する 168 種類の細胞内タンパク質の中から、以下の基準に従い、機能解析を行う候補分子を選定した。単球細胞表面への結合量が多かったもの、損傷線維芽細胞からの放出量が多かったもの、これまでに蓄積した疾患プロテオームデータベース中に含まれ、病態との相関が示唆されるもの、および既に新しい分子機能を特定したものの。タンパク質標品は、市販の精製タンパク質、およびヒト培養細胞 mRNA より cDNA クローニングを行い、293 細胞で発現させたタグ付き組換えタンパク質を使用した。

### (2) 潜在的機能分子の細胞影響解析 (サイトカイン産生)

U937 細胞は、血清を含む RPMI1640 培地中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞影響解析は、100 nM のホルボールエステル (PMA) で 24 時間刺激した U937 細胞にリボポリサッカライド (LPS) 10 ng/ml、および

各潜在的機能分子 (0.1 mg/ml) を添加し、さらに 24 時間培養後、培地を回収し、培地中のサイトカイン (IL-6, TNF) 濃度を測定した。

(3) 潜在的機能分子の細胞影響解析 (細胞内シグナリング)

U937 細胞を LPS、あるいは潜在的機能分子にて刺激し、経時的に細胞を回収した。キナーゼインヒビター、およびプロテアーゼインヒビターを含む緩衝液中で細胞を破碎し、ウエスタンブロットを行った。検出は、キナーゼのリン酸化ペプチド配列に対する抗体にて行った。

(4) 単球表面における潜在的機能分子の相互作用解析 (単球表面受容体の単離)

潜在的機能分子をアガロースビーズ (NHS-activated Sepharose4 FF) に高密度で固定化し、微小なアフィニティークラムを作製した。U937 細胞表面をリジルエンドペプチダーゼで限定的に消化し、得られた細胞膜タンパク質の可溶性領域を含む混合物を濃縮後、アフィニティークラムに負荷した。リン酸緩衝液で洗浄後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) により結合したタンパク質断片を溶出した。

(5) 単球表面における潜在的機能分子の相互作用解析 (タンパク質同定)

U937 細胞表面より得られたタンパク質断片混合物は、常法に従って、8 M 尿素変性、還元・アルキル化、およびトリプシン消化を行い、ナノフロー液体クロマトグラフィー・質量分析システムにより分析した。

#### 4. 研究成果

(1) 潜在的機能分子と急性期病態

はじめに、既に同定した単球表面結合能を持つ 168 種類の細胞内タンパク質リストより、結合・漏出実験における相対量 (質量分析データのヒット数) および既知の分子機能や疾患との関連に基づき、6 種類の核酸結合タンパク質、5 種類の代謝酵素、1 種類のシャペロン、1 種類の翻訳関連タンパク質、および 2 種類の疾患マーカーを含む 15 種類の潜在的機能分子を選択した。急性期病態との関連について、これまでに蓄積した疾患プロテオームデータに基づき解析した結果、これらのタンパク質が健常群において検出限界以下であり、一部については、蘇生後脳脊髄液中で上昇傾向にあることが確認された。

(2) 単球機能への影響

潜在的機能分子の細胞外機能を明らかにするために、U937 細胞をモデルとして、培地中へ潜在的機能分子を添加した時の細胞影響を解析した。LPS で刺激した U937 細胞において、特定の潜在的機能分子は、MAP キナーゼカスケードのリン酸化を増強した。さらに

LPS 非存在下でもリン酸化の増強が確認されたことから、この潜在的機能分子は、単球に対するシグナル分子として機能することが示唆された。一方、PMA で刺激した U937 細胞における炎症性サイトカイン (IL-6, TNF) の産生に関しては、検討を行った濃度、時間の範囲内では、いずれの潜在的機能分子も添加の有無で有意な差は見られなかった。

(3) 受容体の探索

シグナル分子として単球に作用することが明らかになった潜在的機能分子について、そのターゲットとなる受容体の同定を試みた。不溶性膜タンパク質の相互作用解析は、試料の可溶化と複合体形成を両立させることができず、しばしば試料調製に困難を伴う。そこで、本研究では、単球表面をプロテアーゼにて限定的に消化し、得られた膜タンパク質の可溶性領域について相互作用解析を行った。潜在的機能分子を NHS-activated Sepharose4 FF に共有結合させたアフィニティークラムを作製し、U937 細胞より調製した細胞膜タンパク質画分を負荷した。非結合画分を洗浄後、常法により溶出し、得られた結合画分について、変性、還元・アルキル化、トリプシン消化を行い、Direct nanoLC-QTOF 質量分析システムにより解析した。ケラチン類や消化酵素のトリプシンを除外後、コントロール実験での同定タンパク質と比較を行い、最終的に 4 種類のタンパク質が潜在的機能分子の結合パートナーとして同定された。

(4) 想定される細胞影響の分子機序

同定されたタンパク質には、アポトーシス関連分子、代謝酵素、細胞骨格関連分子に加えて、細胞膜貫通型の受容体が含まれていた。この受容体は、細胞骨格の再構成を通じて細胞接着や移動、貪食に関与することが知られていた。また、シグナル受容体としても機能することが報告されており、今回検討した潜在的機能分子に対する単球表面の受容体である可能性が高い。さらに、この受容体は単球に加えて内皮でも発現していることから、単球と内皮の接着、あるいは内皮の細胞内シグナルへ直接作用することにより、急性期の炎症反応を制御している可能性がある。

(5) まとめ

本研究を通じて、組織損傷にともない放出される細胞内タンパク質の細胞外での新たな機能の一端が明らかになった。潜在的機能分子は、組織損傷時に細胞内から漏出し、単球表面に結合する。結合した潜在的機能分子は、単球の細胞内シグナルカスケードのリン酸化を増強する。単球表面の受容体は、膜貫通型タンパク質で、細胞接着に関わる細胞外ドメインと細胞骨格調節に関わる細胞内ドメインを有する。この受容体は、内皮上にも発現することから、この潜在的機能分子は、単球を損傷部位に誘導し、血管内皮表面への

接着や組織内部への遊走、傷害組織・細胞断片の除去などに関与していることが想定される。今回、組織の損傷・修復という観点から、急性期病態、とりわけ炎症反応における機能的意義が明らかになってきた細胞内からの漏出タンパク質は、病態モニターのためのバイオマーカーとしてのみならず、新しい治療ターゲットとして有用である。

#### 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 1 件)

Akiyoshi Y, Izumi T, Oda Y, Mizukami Y, Tsuruta R, Maekawa T. Analysis of cerebrospinal fluid proteins reveals association of calbindin 1 concentrations with neurological outcomes in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest: a proteomics based pilot study. Bull Yamaguchi Med Sch, 査読有, 61:(3-4)23-35, 2014.

##### 〔学会発表〕(計 1 件)

宇留島裕, 泉友則, 渡邊健司, 濱野公一, 水上洋一: エイズ侵入タンパク質を用いた乳がん発症因子のハイスループットスクリーニング. 山口大学生命医工学センターシンポジウム, 2014年12月26日, 山口大学常盤キャンパス(山口県・宇部市)

##### 〔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 1 件)

名称: 急性中枢神経障害の予後判定方法  
発明者: 前川剛志、泉友則、小田泰崇、秋吉祐樹  
権利者: 国立大学法人山口大学  
種類: 特許  
番号: 特許第 5555846 号  
取得年月日: 平成 26 年 6 月 13 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

泉友則 (IZUMI, Tomonori)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00261694

##### (2) 研究分担者

田岡 万悟 (TAOKA, Masato)  
首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号: 60271160

##### (3) 連携研究者

前川 剛志 (MAEKAWA, Tsuyoshi)  
山口大学・名誉教授  
研究者番号: 60034972

##### (4) 研究協力者

岡田 紗依 (OKADA, Sae)  
山口大学・医学部保健学科・卒業研究生