

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08845

研究課題名(和文) Angpt12による新規マクロファージ活性化機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism of macrophage activation by Angpt12

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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い。これまで私共は培養細胞が産生するAngpt12が腹腔マクロファージを活性化することを明らかにしてきた。
本研究では腹腔マクロファージを活性化するAngpt12の解析を行い、Angpt12がマウス腹腔マクロファージ、単球を活性化する物質と相互作用していることを明らかにし、炎症におけるAngpt12の新たな作用機序を提起した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症は肥満に伴う糖尿病などの生活習慣病や自己免疫疾患、アルツハイマー型認知症等の神経疾患、癌の発症から進行といった疾患に共通する基礎病態である。
本研究で明らかになったAngpt12に結合し、免疫細胞を活性化する作用を持つ生体由来の物質の解明が進めば、Angpt12の関与する炎症反応を制御することが可能になり、慢性炎症の関与する疾患の治療につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Angpt12 activate mouse peritoneal macrophages. 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 binds to unknown substances which activates resident murine peritoneal monocytes and macrophages. These results demonstrate a novel role for Angpt12 in inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：Angpt12 マクロファージ 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は肥満に伴う糖尿病などの生活習慣病や自己免疫疾患、アルツハイマー型認知症等の神経疾患、癌の発症から進行といった疾患に共通する基礎病態である。その炎症性の病態形成には組織内のマクロファージをはじめとした免疫細胞群の働きが関与している。Angiopoietin-like protein (Angptl) ファミリー蛋白質のうち、Angptl2 は、糖尿病の発症に関与する脂肪組織の慢性炎症を引き起こすことや、関節リウマチ患者の滑膜組織で高発現していることなど、慢性炎症を伴う病態への関与が国内外の研究グループから報告され、注目されてきた。しかしながら、Angptl2 がどのように慢性炎症の発症に関与しているのか、その標的細胞をはじめとし、ほとんど明らかになっていなかった。我々はこれまで Angptl2 による造血幹細胞増殖促進機構の解明に取り組み、造血幹細胞における Angptl2 の受容体が抑制性免疫グロブリン様受容体 LILRB2 であることを明らかにしてきた (Nature 2012, 485: 656-660)。免疫グロブリン様受容体を発現する免疫細胞に対する Angptl2 の働きを研究する過程で、培養細胞に産生させた Angptl2 が腹腔マクロファージを特異的に活性化することを見出したことから、Angptl2 によるマクロファージの活性制御が慢性炎症の病態形成に関与していると考えた。

2. 研究の目的

Angptl2 の関与する慢性炎症の症状をコントロールする為には、Angptl2 が炎症の発症・維持のプロセスにどのように関わっているかを明らかにする必要がある。そこで本研究課題では、Angptl2 がどのような分子機構でマクロファージの機能を制御しているか解析し、Angptl2 によるマクロファージ活性化の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HEK293T 培養細胞由来の分泌型 Angptl2 の性状解析

HEK293T 培養細胞由来の分泌型 Angptl2 蛋白質の性状解析を行い、安定した腹腔マクロファージ活性化能を持つ Angptl2 を産生、精製する条件を検討した。

(2) Angptl2 の結合を指標とした Angptl2 受容体の同定

分泌型 Angptl2 蛋白質の各種培養細胞への結合を調べた結果、HEK293T、C2C12、NIH3T3、EAHY 細胞に非常に強く結合を示し、THP1、Raw、Jurkat などマクロファージ等の血球系細胞には中程度の結合を示したが、マウス proB 細胞株 Ba/F3 細胞には全く結合しなかった。そこで HEK293T 細胞のレトロウイルス cDNA 発現ライブラリーを作成し、Ba/F3 細胞に導入、Angptl2 の細胞表面への結合を指標に Angptl2 結合の責任遺伝子の同定を試みた。Angptl2 アフィニティーカラムを作製し、マウス肝細胞、脾臓細胞抽出液から Angptl2 に結合する細胞外蛋白質の分離を試みた。細胞表面に結合した Angptl2 を化学的架橋後、免疫沈降法により分離、結合している分子の単離を試みた。

(3) 各種培養細胞に結合した Angptl2 を細胞表面分子と化学架橋すると、Urea など強力な蛋白質変成剤によっても抽出できないことから、Angptl2 は、グルコサミノグリカン (GAG) のような巨大な非蛋白質分子に結合し、活性を示す可能性が考えられたため、代表的な GAG であるヒアルロン酸 (HS)、コンドロイチン硫酸 (CS) の Angptl2 による腹腔マクロファージの活性化に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) Angptl2-Flag 産生 HEK293 細胞の培養液中に分泌される Angptl2 を抗 Flag 抗体で分離精製すると Angptl2 全長と中間部分で切断された分子量約 3 万の C 末端 (Angptl2-分解) 領域が得られる。精製した Angptl2 の腹腔マクロファージ活性化能は一定ではなく、細胞密度や培養時間、FCS 濃度などの培養条件の違いによって変化した。また、腹腔マクロファージの活性化は

Angpt12 分解産物の割合が多いほど強くなる傾向があることが明らかになった。(図1)。Angpt12C 末端断片が活性を示す可能性が考えられたが、ゲルろ過により分離した Angpt12C 末端断片は活性を示さなかった。また、全長の Angpt12 はデキストラン・高架橋アガロースのゲルろ過では溶出されず、全ての溶出画分で腹腔マクロファージに炎症性サイトカインを誘導する活性を検出できなかった。精製した Angpt12 は、脱ペプチドを目的とした透析処理後もマクロファージの活性は失われなかったことから、Angpt12 の活性は Angpt12 蛋白質の糖や脂質など何らかの修飾によるもの、あるいは Angpt12 に結合するゲルろ過では分離できない物質に依存している可能性が示唆された。

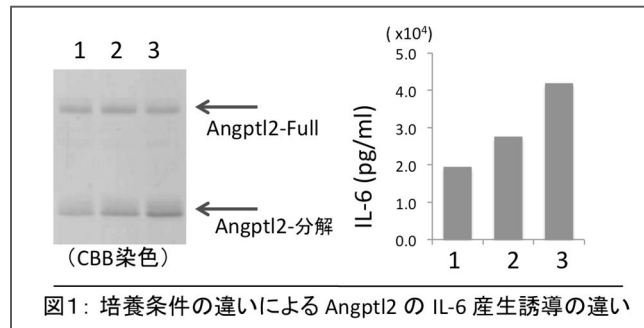


図1: 培養条件の違いによる Angpt12 の IL-6 産生誘導の違い

(2) HEK293T 細胞の Total RNA からレトロウイルス cDNA 遺伝子発現ライブラリーを構築し、Angpt12-Flag 蛋白質の細胞表面への結合を指標に FACS による分離、濃縮を試みた。5 サイクルの FACS による分離、濃縮を繰り返したが、Angpt12 蛋白質特異的に結合を示す Ba/F3 細胞を得る事が出来なかった。HEK293T 細胞に発現させた Angpt12-Fc 蛋白質を用いたアフィニティーカラムを作製し、肝臓、脾臓の RIPA ブッファーおよび 1% NP-40 抽出液から結合蛋白質の分離を試みた。それぞれ数本の特異的な蛋白質(図2)を分離、質量分析による同定を行ったところ、Angpt12 特異的に結合した蛋白質はすべて本来生理的条件下では会合することが期待できないミトコンドリアの蛋白質、代謝酵素であった。HEK293T 培養細胞に結合した Angpt12 を DTSSP により化学的架橋し免疫沈降実験を行った。細胞に結合した Angpt12 は様々な界面活性剤処理によっても抽出する事が出来ず、結合蛋白質を抽出、同定する事が出来なかった。細胞表面分子と化学架橋した Angpt12 は Urea など強力な蛋白質変成剤によっても抽出する事ができないことから、Angpt12 は受容体蛋白質ではなく、グルコサミノグリカンのような、巨大な非蛋白質分子と結合している可能性が示唆された。

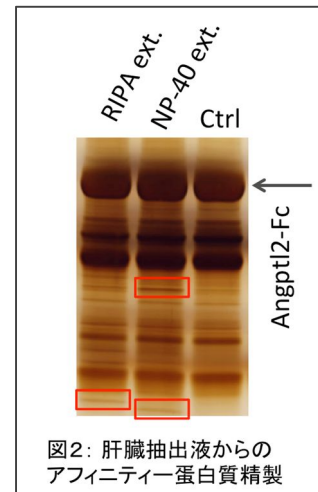


図2: 肝臓抽出液からのアフィニティー蛋白質精製

(3) CS (10 μg/ml) は Angpt12 による腹腔マクロファージの活性化に伴う IL-6 の産生に影響を与えなかったが、HS (10 μg/ml) は Angpt12 による腹腔マクロファージの活性化に伴う IL-6 の産生を約 3 倍に増強した(図3)。また、HS (10 μg/ml) は単独でも腹腔マクロファージの活性化を誘導した。精製した Angpt12 溶液に GAG が含まれるかどうか DMMB 法で定

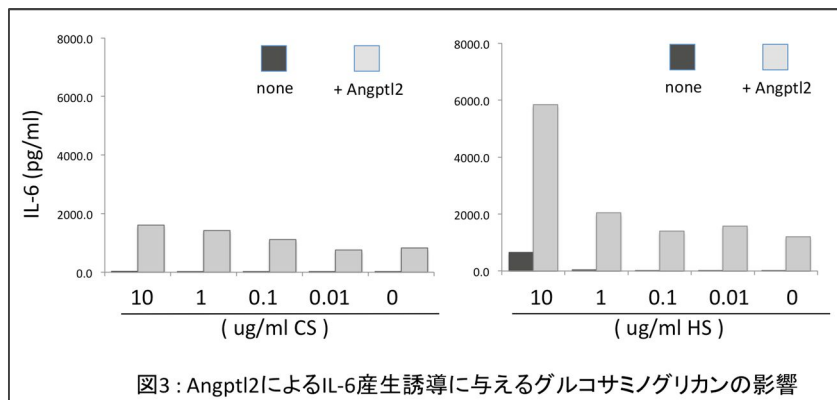


図3: Angpt12によるIL-6産生誘導に与えるグルコサミノグリカンの影響

量したところ、検出限界 (0.25 μg/ml) 以下であった。Angpt12 の使用濃度 (1/50 量) から計算しても混入する GAG は最も高濃度でも 0.005 μg/ml であるため、Angpt12 溶液に GAG が含ま

れていたとしても、腹腔マクロファージの活性化に影響を与えない濃度であると推察された。以上の結果から、GAG は Angpt12 の腹腔マクロファージに対する作用に影響を与えるが、本研究で解析対象としている腹腔マクロファージの活性化を誘導する本体ではないと考えられた。

以上のように本研究で Angpt12 による腹腔マクロファージの活性化には Angpt12 と受容体の相互作用と言う単純な機構だけではなく、Angpt12 の何らかの修飾や、結合する分子が関与する事が明らかになった。今後は Angpt12 の修飾や、結合する分子の解析を進め、腹腔マクロファージ活性化の分子機構を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----