

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15324

研究課題名(和文) ヒトデ幼生のマクロファージ遊走阻止因子による炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory system of inflammation by two macrophage migration inhibitory factors in starfish larvae

研究代表者

古川 亮平 (FURUKAWA, Ryohei)

慶應義塾大学・文学部(日吉)・助教

研究者番号：90458951

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)：本研究では、系統進化的に最も原始的なサイトカインの一つと考えられているマクロファージ遊走阻止因子(MIF)に着目し、ヒトデ幼生の免疫細胞が発現する2種のMIF(ApMIF1およびApMIF2)に対する受容体と、その下流に存在する細胞内シグナルを探索した。2種のリコンビナントMIFで処理したヒトデ幼生の免疫細胞におけるRNA-seq解析の結果、MIFの下流ではMAPKおよびPI3K/Aktシグナル経路が存在することが示唆された。さらに、受容体候補として2種のGタンパク質共役型と、2種の受容体型チロシンキナーゼが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類においてMIFは様々な疾患への関与が推測されており、その生理機能の全容解明が待たれている。解決すべき最も重要な課題は、進化的に保存された受容体の同定である。本研究において、同定までは至っていないが、4種類の受容体候補が得られている。今後詳細な機能解析を通して受容体を明らかにできると期待している。一方、MIFの下流に存在するシグナル経路に関しては、哺乳類での知見と一致する経路が得られており、MIFの作用の進化的保存性が推測される。近い将来、受容体の同定とこれらのシグナル経路の関連性が明らかになれば、幅広い動物種における炎症制御機構の共通原理を提示できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is thought to be one of the most primitive cytokines in phylogenetic evolution. In this study, to understand the regulatory system of inflammation by MIF in starfish larvae, we searched the receptor(s) of two types of MIF (ApMIF1 and ApMIF2) and the downstream signaling pathway(s) from the immune cells. RNA-seq analysis in the larval immune cells treated with two recombinant MIFs suggested that MAPK and PI3K/Akt signaling pathways exist downstream of MIFs. Furthermore, two types of G protein-coupled receptors and two types of receptor tyrosine kinases were obtained as receptor candidates. These results provide useful insights for understanding the evolutionary conservation and diversity of regulatory system of MIF-mediated inflammation.

研究分野：比較免疫学

キーワード：棘皮動物ヒトデ 幼生 間充織細胞 炎症制御 マクロファージ遊走阻止因子 トランスクリプトーム解析 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞のリクルートは炎症反応や関連疾患の発症において重要なステップであるが、無脊椎動物においてその制御メカニズムはほとんど分かっていない。マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) は、植物を含め幅広い生物種に存在することから最も原始的な炎症性サイトカインの一つとして知られる。近年、ヒトの様々な慢性炎症に MIF が関与していることが明らかとなるにつれ、進化的に保存された炎症反応のキーレギュレーターである可能性が指摘されている。さらに、哺乳類 MIF がケモカイン受容体 CXCR2 及び CXCR4 のリガンドとして炎症反応時の免疫細胞の移動を制御していることが明らかになり (Bernhagen *et al.*, 2007)、MIF を介した細胞間相互作用がケモカインシステムの祖先型である可能性も推測されている。一方で、その詳細な生理機能については未だ不明な点が多く、解決すべき重要な課題である。興味深いことに、これまでに報告された MIF 受容体は、CXCR2、CXCR4 及び主要組織適合遺伝子複合体 MHC のインバリエント鎖である CD74 のみであり、これらは近年の比較ゲノム解析から無脊椎動物には存在しないことが示唆されている。従って、炎症制御を中心とした MIF の詳細な生理機能の解明を目指す上で、進化的に保存された未知の MIF 受容体の同定は急務であり、これには比較生物学的アプローチが有用である。

ヒトデの幼生は、貪食作用の発見により細胞性免疫学の扉を開いた記念碑的な動物である。代表者が材料として用いているイトマキヒトデ (*Patiria (Asterina) pectinifera*) の幼生の免疫系は、間充織細胞と呼ばれる 1 種類の細胞種によって構築される (図 1)。代表者は、免疫応答時の間充織細胞の詳細な行動解析系を *in vivo* 及び *in vitro* で開発し、間充織細胞が示す異物や炎症部位への移動、細胞融合を伴う貪食及び包囲化作用のダイナミクス等の解析を通して、間充織細胞の免疫行動は哺乳類のマクロファージと非常に共通性が高いことを明らかにした (Furukawa *et al.*, 2009)。さらに、この成果を基に、ヒトデ幼生の間充織細胞が、系統進化的視点から「最もシンプルな細胞性免疫システムとはどのようなものか？」という問題に取り組む上で有用なモデルであることを示してきた。

最近代表者は、間充織細胞による炎症部位への移動制御メカニズムの理解を目指して MIF に着目し、間充織細胞で発現する 2 種の MIF、*ApMIF1* 及び *ApMIF2* がそれぞれ「走化性阻止因子」、「走化性因子」として差別的に作用することにより、炎症部位へリクルートされる間充織細胞の数を適切に制御していることを明らかにした (Furukawa *et al.*, 2016、図 2)。さらに、予備解析から、ある種の抗炎症性サイトカインの発現制御においても、2 つの MIF が逆の制御能を示す予備的データを得ており、ヒトデ幼生の MIF が示す差別的な機能発現が、走化性のみならず、免疫応答の開始から終結までを制御している可能性が浮かび上がってきている。一方で、受容体及び下流のシグナルについては未だ不明であり、今後の課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトデ幼生の MIF による炎症制御機構の理解を目指し、(1) *ApMIF1* 及び *ApMIF2* の受容体と、(2) *ApMIF1* 及び *ApMIF2* が制御する細胞内シグナルの同定を目的とした。この 2 つのアプローチを通して、MIF が関与する炎症制御機構の進化的な保存性と多様性を理解するための分子基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

【MIF 受容体の探索】

ApMIF 及び *ApMIF2* は間充織細胞のみならず上皮細胞でも発現し、細胞増殖に関与していることも示唆されている。そこで、受容体探索の材料を間充織細胞に限定せず、幼生の全細胞を用いた。還元剤で切断可能な細胞膜不透過性クロスリンカー (Dithiobis

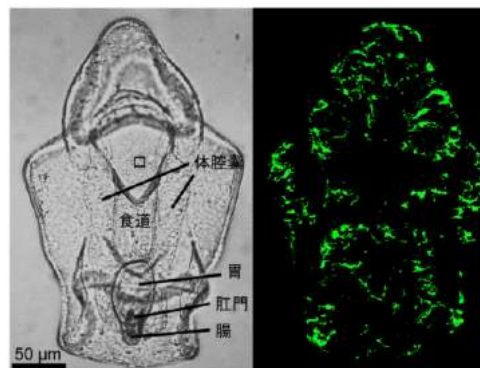


図 1 : ヒトデ幼生と間充織細胞

受精後 4 日後のピピンナリア幼生 (左) の間充織細胞 (右、間充織マーカーによる染色像)。

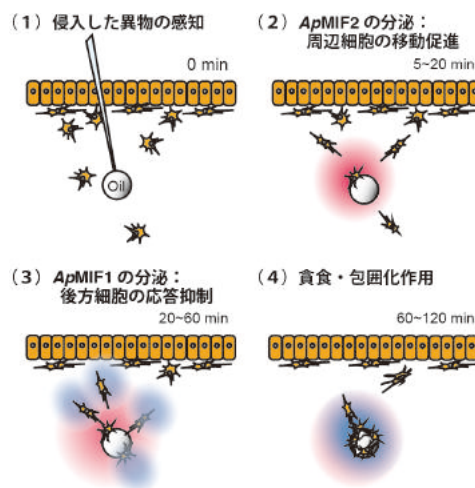


図 2 : 予想される *ApMIF1* および *ApMIF2* の作用機序

(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt: DTSSP; DOJINDO) を用いて、*in vitro* で *ApMIF1* または *ApMIF2* の His-Tag 融合リコンビナントタンパク質 (rMIF1 または rMIF2) と、受精 3 日後のビピンナリア幼生の解離細胞から抽出した膜画分をクロスリンクさせた。その後、His-Tag アフィニティカラムを用いて各 rMIF との複合体を回収した。これらの複合体を還元条件下で SDS-PAGE し、rMIF と相互作用するタンパク質のバンドを切り出した後、質量分析計 (LC-MS/MS) で解析した。質量分析から得られたアミノ酸配列をクエリーとし、取得済みのヒトデ幼生のトランスクリプトームデータに対して TBLASTN サーチを行った。

同時に、酵母 Two-Hybrid 法による受容体探索も試みた。単離した間充織細胞に対して、リポポリサッカライド (最終濃度 1 μ M) で免疫刺激を与え、30 分毎に 2 時間後までサンプリングした。total RNA を抽出後、全サンプルの RNA を混合し、Make Your Own “Mate & Plate” Library System (Clontech) を用いてライブラリーを作成した。Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) を用いて、*ApMIF1* または *ApMIF2* をベイトとしてスクリーニングを行った。

【RNA-seq 解析による MIF 下流シグナルの探索】

先行研究から、*ApMIF2* で誘導される移動速度の上昇は、刺激後 30-40 分で最大となることが明らかとなっている。この時間は、*in vivo* において、間充織細胞が異物注射部位に集積するまでの時間にほぼ等しい。また、間充織細胞による包圍化作用はほぼ 2 時間以内に完了する。これらを基に、rMIFs を *in vitro* で間充織細胞に添加し、図 3 に示すタイムコース (①~⑦) でサンプルを回収して RNA-seq に供した。

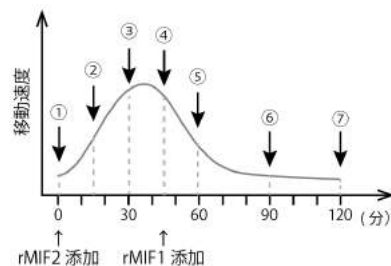


図 3 : サンプリングスケジュール

取得済みのヒトデ幼生のトランスクリプトーム

データをリファレンスとして発現量を算出し、edgeR を用いた ANOVA-like な尤度比検定により発現変動遺伝子 (differentially expressed genes, DEGs) を抽出した。得られた DEGs は、機能アノテーションのエンリッチメント解析および遺伝子共発現ネットワーク解析に供し、MIF 刺激によって活性化されるシグナル経路を探索した。また、この共発現ネットワークにおいても、*ApMIFs* の発現パターンもとに受容体候補を探索した。

4. 研究成果

【融合タンパク質と架橋剤を用いた MIF 受容体の探索】

受精 3 日後のビピンナリア幼生の解離細胞から抽出した膜画分を、rMIF1 または rMIF2 と還元条件下で切断可能な架橋剤 DTSSP を用いて架橋し、rMIF1 または rMIF2 と受容体の複合体の精製を試みた。

His タグに対するアフィニティ精製産物において、36kDa 付近に CBB 染色レベルでともに 1 本ずつバンドが検出された (図 4、マゼンタ)。これらを切り出して精製し、LC-MS/MS 解析に供し、得られた部分アミノ酸配列を、取得済みのトランスクリプトームデータから探索した。その結果、それぞれ *ApMIF1* 及び *ApMIF2* がヒットした。

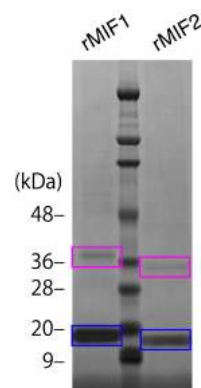


図 4 : His-tag アフィニティカラムで溶出された rMIFs と架橋されたタンパク質

青枠は、rMIF1 および rMIF2 の単量体。これに加えて、マゼンタで囲ったバンドが検出されている。

この結果は、ヒトデ幼生の MIF は、それぞれホモ二量体として機能していることを示唆している。哺乳類の MIF においても、MIF がその濃度依存的に二量体、三量体を形成して機能していることが示唆されており (Mischke *et al.*, 1998)、ヒトデの MIF も同様の分子特性を備えていると推測される。*ApMIF1* および *ApMIF2* がヘテロ二量体を形成することができるかは非常に興味深い問題である。もしヘテロ二量体を形成するのであれば、*ApMIF1* による *ApMIF2* の機能阻害機構が明らかになるかもしれない。今後の課題である。

一方、架橋剤を用いた方法では、受容体の候補分子は得られなかった。これは、受容体の発現量が非常に低いためだと推測している。そこで、ライブラリー作製時に発現遺伝子の PCR による増幅工程がある酵母 Two-Hybrid 法による受容体探索に切り替えた。単離した間充織細胞を、強力な免疫活性化能を持つリポポリサッカライドで処理し、経時的なサンプリングを通して抽出した RNA を混合して prey ライブラリーを作製した。現在精力的にスクリーニングを進めており、近い将来ヒトデ幼生の MIF 受容体が同定できると期待している。

【RNA-seq 解析による MIF 下流シグナルの探索】

図 3 に示した経時サンプルの RNA-seq データから、タンパク質をコードする 29,281

unigene 中、1,170種の unigene が発現変動遺伝子 (differentially expressed genes; DEGs) として得られた。この DEGs のリストを用いて、MIF の下流シグナルの探索を試みた。

DEGs から 855 種の official gene symbol がアノテーションとして得られた。タンパク質をコードする 29,281 種の unigene から得られた 7,310 種の official gene symbol をバックグラウンドとして、DEGs のエンリッチメント解析を行ったところ、86 種のパスウェイが有意に濃縮された (false discovery rate (FDR) < 0.05)。この中には Chemokine signaling pathway を始め、Cell cycle、Apoptosis、Ras signaling pathway、PI3K-Akt signaling pathway、HIF-1 signaling pathway、MAPK signaling pathway、Wnt signaling pathway、TGF-beta signaling pathway 等、MIF との関連が報告されているパスウェイが多く含まれていた。さらに、ガン関連 (Pathways in cancer)、免疫・感染応答関連 (Epstein-Barr virus infection、HTLV-I infection、Endocytosis)、細胞接着関連 (Adherence junction、Rap1 signaling pathway、Cell adhesion molecules)、細胞骨格関連 (Axon guidance) のパスウェイなども見出すことができた。これらの事実は、哺乳類と同様、ヒトデ幼生においても MIF が多くの細胞内シグナルを制御するサイトカインであることを示唆している。実際、機能アノテーションのクラスター分析では、Tuberculosis や Herpes simplex infection といった免疫/感染応答に関わるアノテーションのみならず、TGF-beta signaling pathway や cell cycle などの細胞増殖、細胞周期関連アノテーションや、TNF signaling pathway や Apoptosis といった細胞死に関連する機能アノテーションがクラスターを形成した。

MIF の下流シグナルをさらに絞り込むため、上記 DEGs の相関係数の相互ランクを指標として共発現ネットワーク共発現ネットワークを構築したところ、1つの連結したネットワークが得られた (図 5 A)。このグラフデータを用いて、スピングラス法によるコミュニティ抽出および中心性解析を行い、MIF 周辺の共発現ネットワークを詳細に調べた。このネットワークの中で、*ApMIF1* は 42 種の遺伝子からなるコミュニティに、*ApMIF2* は 38 種の遺伝子からなるコミュニティに属していた (図 5B,C)。各コミュニティの中心性を調べたところ、*ApMIF2* は属するコミュニティの中で高い中心性を示し (次数中心性; 4 位、媒介中心性; 5 位)、コミュニティ内で重要な役割を担っていることが推測される。興味深いことに、*ApMIF2* の共発現コミュニティには、キナーゼ活性を有する膜タンパク質が多く存在した。一方、所属コミュニティにおける *ApMIF1* の中心性については、次数中心性は 3 位と高かったが媒介中心性は 40 位であった。*ApMIF1* の共発現コミュニティにおいても、*ApMIF2* と同様にキナーゼ活性の機能アノテーションがクラスターを形成した。

以上の結果を総合して考慮すると、ヒトデの 2 種の MIF の下流には、MAPK および PI3K/Akt シグナル経路が存在すると考えられる。

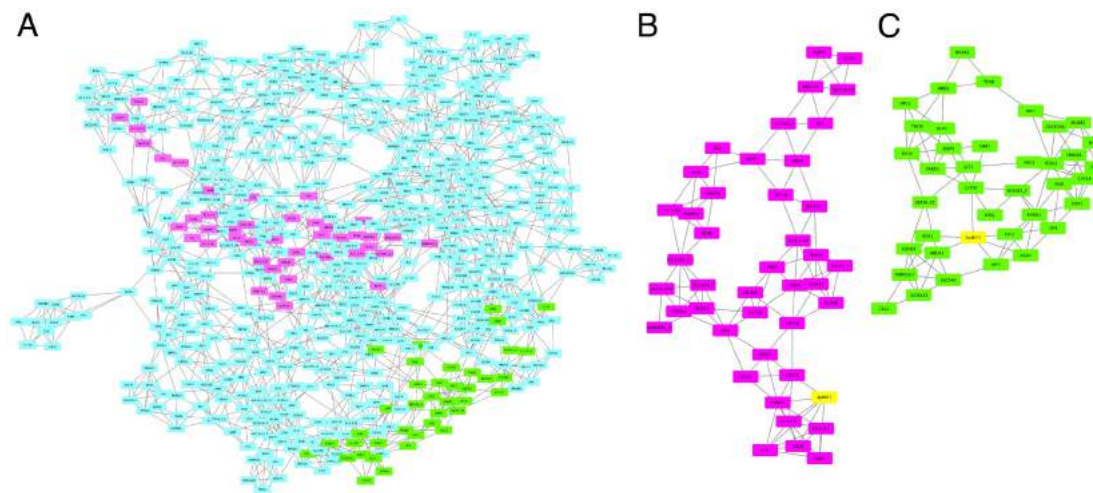


図 5 : MIF で処理した間充織細胞における発現変動遺伝子 (DEGs) の共発現ネットワーク

A: 全 DEGs で構築した共発現ネットワーク。855 種の DEGs が含まれている。マゼンタおよび緑のネットワークは、それぞれ *ApMIF1* および *ApMIF2* を含むコミュニティを示している。それぞれ B および C に対応している。B: *ApMIF1* (黄) を含むコミュニティ。42 種の DEGs からなる。C: *ApMIF2* (黄) を含むコミュニティ。38 種の DEGs からなる。

ApMIF1 および *ApMIF2* の共発現コミュニティから MIF の受容体の候補となりうる膜タンパク質を探したところ、*ApMIF1* のコミュニティに G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が 1 種、*ApMIF2* のコミュニティに GPCR が 1 種と受容体型チロシンキナーゼが 2 種存在した。これらは全て、MAPK や PI3K/Akt シグナルを活性化出来る可能性がある。現在、モルフォリノアンチセンスオリゴによるノックダウンを通して、これらの膜タンパク質が受容体となりうるかを検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川亮平、諸橋和紀、金子洋之
2. 発表標題 ヒトデ幼生のマクロファージ遊走阻止因子下流シグナルの探索
3. 学会等名 日本比較免疫学会 第30回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Smith, LC., Arriza, V., Barela Hudgell, MA., Barone, G., Bodnar, AG., Buckley, KM., Cunsolo, V., Dheilily, N., Franchi, N., Fugmann, SD., Furukawa, R., Garcia-Arraras, J., Henson, JH., Hibino, T., Irons, ZH., Li, C., Lun, CM., Majeske, AJ., Oren, M., Pagliara, P. et al.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Publisher	5. 総ページ数 1048 (409-501)
3. 書名 Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms. In "Advances in Comparative Immunology", EL Cooper, ed.	

〔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
---------------------------	-----------------------	----