

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591202

研究課題名 (和文) マクロファージのフォスホリパーゼ A₂ 依存殺菌メカニズム
に関する分子生物学的研究研究課題名 (英文) Molecular biological study on macrophage antimicrobial mechanism
based on phospholipase A₂

研究代表者

富岡 治明 (TOMIOKA HARUAKI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：40034045

研究成果の概要 (和文)：cPLA₂ 依存性マクロファージ殺菌能について、分子生物学的な手法による解析を試みたが、各種 PLA₂ 阻害剤を用いた検討、各種 PLA₂ 発現プロファイル、アポトーシスに連動したマクロファージ殺菌能の増強についての成績は cPLA₂ の重要性を示すものであった。また、cPLA₂ の細胞内移行と活性化の様相を直接調べるためにマクロファージや CHO 細胞に GFP 標識 cPLA₂ を発現させるための試みは、一定の成果を生みつつある。

研究成果の概要 (英文)：We investigated macrophage (MΦ) antimicrobial activity against mycobacteria based on phospholipase A₂ (PLA₂) using molecular biological techniques. (1) Among PLA₂ isotype inhibitors, cytosolic PLA₂ (cPLA₂) inhibitor mildly reduced MΦ anti-mycobacteria activity. (2) MΦ expression of cPLA₂ and secretory PLA₂-V mRNAs were up-regulated after infection with mycobacteria. (3) cPLA₂ potentiated MΦ anti-mycobacteria activity coupled with apoptosis in the early stage. (4) GFP-tagged cPLA₂ translocated to the membrane of MΦ or CHO cells. Overall, it can be concluded that the cPLA₂-mediated antimicrobial mechanism contributes to MΦ's bactericidal and bacteriostatic function against mycobacterial pathogens but such cPLA₂-dependent mechanism does not play a central role in the MΦ antimycobacterial function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：マクロファージ, 抗酸菌, 殺菌メカニズム, phospholipase A₂

1. 研究開始当初の背景

マクロファージの殺菌エフェクターについては、活性化窒素 (RNI) や活性酸素 (ROI) などが知られているが、結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの抗酸菌の殺菌には、実際にどのようなエフェクター分子が関わっているのかについては

不明な点が多い (富岡：臨床免疫, 2001 (総説))。例えば、結核菌に対するマクロファージ殺菌エフェクターとしては、RNI の役割が大きいとされているが、他方、MAC の殺菌には RNI の関与は部分的なものに過ぎないとされており、何れの場合も ROI の積極的な関与は否定的である。申請者の 2007 年までの検

討により、抗酸菌の殺菌にはアラキドン酸の果たす役割が大きいことが明らかにされてきており、アラキドン酸は細胞内寄生菌に対するマクロファージの新しいタイプの殺菌エフェクターとして注目されている（富岡：臨床免疫，2003（総説））。すなわち，(1)マクロファージの phagosome 内局在菌に対するアラキドン酸の殺菌作用発現には phospholipase A₂ (PLA₂)，特に細胞質 PLA₂ (cPLA₂) が重要であること (J Leukoc Biol, 1997; Clin Exp Immunol, 2000)，さらに，(2)抗酸菌に感染したマクロファージでは、実際に共焦点レーザー顕微鏡での観察で cPLA₂ の phagosome 膜への translocation が認められること，(3)またこうした反応は、ATP による purinoceptor の刺激で細胞内 Ca²⁺濃度を増加させることによって誘導されること，さらに，(4)活性化マクロファージでは cPLA₂ の mRNA 発現の増強がみられることなどが明らかになってきていた (J Immunol, 2005; 感染症学雑誌, 2004, 2007)。実際に ATP の purinoceptor 刺激によりマクロファージの抗酸菌殺菌能が増強されることが知られているが、上述のような知見をベースに、申請者は当時から、図1のようなモデルを提唱している（富岡 [総説]: 臨床免疫, 2003）。

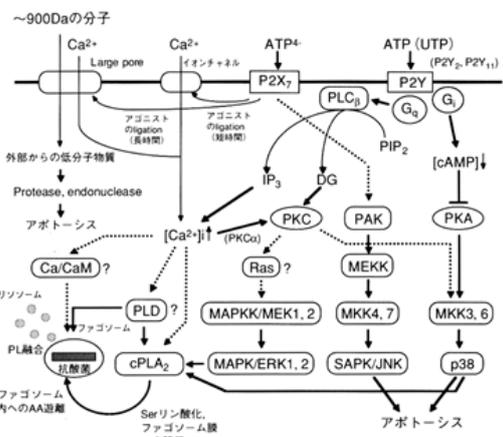


図 1. ATP 刺激を介したMΦの抗酸菌殺菌能亢進のメカニズム

2. 研究の目的

申請者のこれまでの一連の成績からすると、マクロファージの抗酸菌に対する殺菌メカニズムには、cPLA₂の働きにより膜のリン脂質から生成されるアラキドン酸などの遊離脂肪酸が重要な役割を演ずるものと考えられる。本研究では、こうしたこれまでの知見をベースにして、実際に cPLA₂ がどのようなメカニズムでマクロファージ殺菌能に関与しているのかについての検討を試みた。細胞内での cPLA₂ の活性化と translocation に係

る細胞内シグナル伝達系については、Raf-MEK-MAPK pathway や Rac/p38 kinase cascade が知られているが (BBA, 2004; Biochem J, 2005)，抗酸菌菌体成分による刺激を受けた細胞ではどのようなシグナル伝達系がかかわっているのかについては未解明である。そこで本研究では、申請者のこれまでの研究をさらに展開し、マクロファージ内での殺菌メカニズムにおける cPLA₂ の関わりについての分子生物学的な解析を進めるための一連の検討を行うこととした。第一に、マクロファージの抗酸菌に対する殺菌能は arachidonyl trifluoromethylketone (α-TFMK) などの cPLA₂ の阻害剤で抑制されるが、こうした阻害剤の影響については、それらの薬剤の作用の特異性を保証する目的で、マクロファージに対する毒性を考慮した実験条件での測定を行った。さらに、抗酸菌感染マクロファージ内での各種 PLA₂ の発現レベルについても一連の検討を加えた。これらの検討により、マクロファージの細胞内での抗酸菌殺菌における cPLA₂ の重要性を確定することが可能である。次に、抗酸菌のマクロファージ内への取込み (感染) と抗酸菌菌体成分によるマクロファージ機能の活性化に係る補体レセプター3 (CR3) などの各種のレセプター分子と green fluorescence protein-fusion cPLA₂ (GFP-cPLA₂) とを発現させた CHO 細胞を実験モデルにして、抗酸菌感染マクロファージ細胞内での GFP-cPLA₂ の挙動特に、GFP-cPLA₂ がどのようにして細胞質から phagosome 膜に translocate していくのかについて調べる目的で、まずは CR3/GFP-cPLA₂ 発現 CHO 細胞株の樹立を試みた。このモデル系を用いて、いろいろな変異を導入した cPLA₂ が抗酸菌感染マクロファージ内でどのように細胞内 translocation と活性化を起こすのかについて、さらには、マクロファージの種々の細胞表面レセプターからのシグナル伝達系がどのような形で cPLA₂ の活性化と translocation のための pathway にクロストークしているのかに関して詳細に検討することが可能になる。ところで、マクロファージに結核菌の加熱死菌や非病原性抗酸菌を感染させると、強いアポトーシスが誘導され、そのアポトーシスに連動してマクロファージ内での殺菌活性が増強することが知られている。このアポトーシス連動のマクロファージ殺菌能については、cPLA₂ が重要な役割を演じていると言う報告があるが、本研究でも、ピコリン酸や ATP で誘導されるマクロファージアポトーシスとピコリン酸による MAC に対するマクロファージ殺菌能の増強作用との関係について検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) 各種 PLA₂ 阻害剤のマクロファージ殺菌

能ブロッキング作用の測定

各種 PLA₂ 阻害剤を供試して、それらのマクロファージに対する細胞毒性を調べ、細胞毒性の認められない濃度でのマクロファージの結核菌殺菌能に対する阻害効果の用量依存性について検討した。結核菌としては H37Ra 株を供試した。

(2) 結核菌感染マクロファージにおける各種 PLA₂ の mRNA 発現レベルの測定

結核菌 H37Ra 株を感染させて刺激したマクロファージを 3-12 時間培養後、細胞から total RNA を抽出し各種 cPLA₂ のプライマーを用いて RT-PCR 解析を型的如くに行った。

(3) GFP-cPLA₂ 発現マクロファージ・CHO 細胞株の樹立

① GFP-cPLA₂ 発現ベクターのマクロファージ・CHO 細胞株への導入

THP-1 から調整した cDNA をテンプレートとして、PCR 法により hcPLA₂ cDNA を増幅した。この時、hcPLA₂ cDNA の 5' 末端側には EcoRI 制限酵素サイトが、3' 末端側には SalI 制限酵素サイトが付加されるような primer を用いた。得られた cPLA₂ cDNA を pEGFP-N3 プラスミドベクターの multi cloning site 中の EcoRI-SalI サイトに組み込み、cPLA₂-EGFP 融合蛋白発現ベクターを作成した。この cPLA₂-EGFP 発現ベクターを RAW264.7 マクロファージ細胞株および CHO-K1 細胞に、リポフェクション法 (Qiagen, superfect transfection reagent) により導入した。

② CD14, FcγR および CD18 (β2-integrin) 遺伝子の CHO-K1 細胞への導入

ヒト単球様細胞株 THP-1 から調整した cDNA をテンプレートとして、PCR 法によりヒト (h) CD14 cDNA, hFcγR cDNA, hCD18 cDNA を増幅した。このとき hCD14 cDNA では 5' 末端側に EcoRV 制限酵素サイトが、3' 末端側に EcoRI 制限酵素サイトが付加されるような primer を、また hFcγR cDNA では 5' 末端側に NheI 制限酵素サイトが、3' 末端側に BamHI 制限酵素サイトがそれぞれ付加されるような primer を、さらに hCD18 cDNA では 5' 末端側に NheI 制限酵素サイトが、3' 末端側に StuI 制限酵素サイトが付加されるような primer を用いた。この方法で得られた hCD14 cDNA, hFcγR cDNA, hCD18cDNA を pIRESneo2 プラスミドベクターの multi cloning site 中の各々 EcoRV-EcoRI サイト, NheI-BamHI サイト, NheI-StuI サイトに組み込むことにより、hCD14, hFcγR, hCD18 発現ベクターを作成した。これらの遺伝子を組みこんだプラスミドベクターをリポフェクション法 CHO-K1 細胞に導入した。CHO 細胞でのこれら遺伝子の発現については、抗 CD14, 抗 FcγR 抗体または抗 CD18 抗体を用いた間接蛍光抗体法で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

(4) マクロファージのアポトーシスの測定

① Annexin V 法: THP-1 マクロファージ (5 x 10⁵ 細胞/ウェル) に MOI=20 で供試菌を 2 時間感染させた後、ピコリン酸添加あるいは非添加の条件下で 24 時間培養後、細胞を FITC 標識 Annexin V でラベルし、flow cytometry 解析を行った。

② DNA laddering 法: 上述と同様な条件で供試菌を感染させ、ピコリン酸添加あるいは非添加の条件下で 4 日間に亘って培養した THP-1 マクロファージから常法により DNA を抽出し、1.5% アガロース電気泳動にかけ、DNA 断片化の有無とその程度を観察した。

4. 研究成果

(1) 各種 PLA₂ 阻害剤のマクロファージ殺菌能ブロッキング作用

各種 PLA₂ 阻害剤 (manoalide, SPI525145 (sPLA₂-IIA 阻害剤); a-TFMK (cPLA₂ 阻害剤); CPI525143 (cPLA₂α 阻害剤); 12-episcalaradial (EPR: sPLA₂-V 阻害剤); bromoenol lactone (BEL: iPLA₂ 阻害剤)) のマクロファージに対する細胞毒性についてみたところ、50 mg/ml 濃度では、SPI525145 を除いてどれも強い毒性を示し、10 mg/ml 濃度では、manoalide と EPR のみに強い細胞毒性が認められた (図 2)。

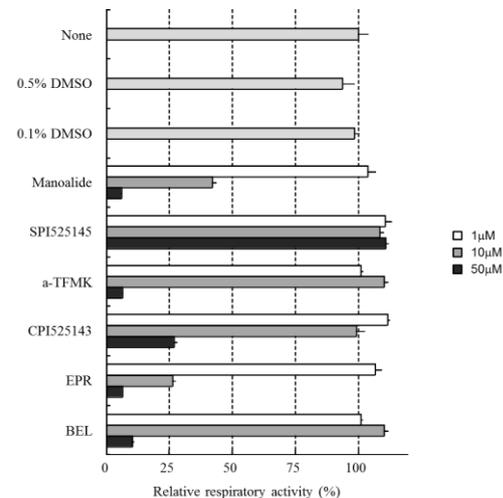


図 2

この結果を基に、細胞毒性のない上限の濃度の各種 PLA₂ 阻害剤を作用させた場合の、マクロファージの結核菌殺菌能に及ぼす影響についてみたところ、a-TFMK のみがブロッキング作用を示すことが分かった (図 3)。この結果より、cPLA₂ 阻害剤である a-TFMK は確かに特異的な形でマクロファージ殺菌能に対するブロッキング作用を示すこと、すなわち、cPLA₂ はマクロファージの抗結核菌殺菌メカニズムにおいて重要な役割を演じていることが確かめられた。なお、cPLA₂α 阻害剤であ

る CPI525143 ではこのような作用はみられないことから、マクロファージの抗結核菌殺菌能を担っている cPLA₂ の isozyme は α isozyme 以外のものと考えられる。

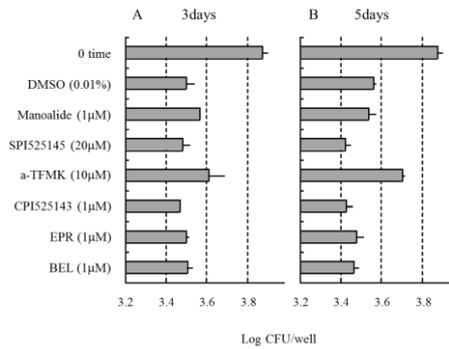


図 3

(2) 結核菌感染マクロファージにおける各種 PLA₂ の mRNA 発現レベル

RT-PCR 法により、結核菌 (H37Ra 株) を感染させたマクロファージにおける各種 PLA₂ の mRNA 発現のプロフィールをみたところ、cPLA₂ mRNA のみが感染 12 時間で発現レベルが高まるのが分かった (図 4)。この成績は、上述の各種 PLA₂ 阻害剤のブロッキング作用についての成績と符合している。

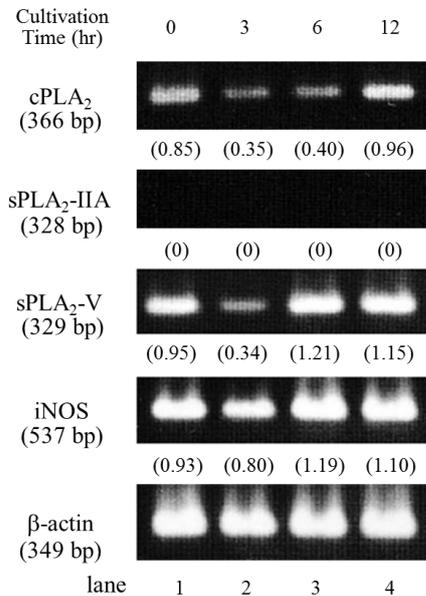


図 4

(3) GFP-cPLA₂ 発現マクロファージ・CHO 細胞株の樹立の試み

① GFP-cPLA₂ 発現ベクターのマクロファージ・CHO 細胞株への導入

RAW264.7 マクロファージ細胞に、野生型 cPLA₂-EGFP 発現ベクター、あるいは S505A, S515A または S727A 変異を導入した cPLA₂-EGFP 発現ベクターをリポフェクション

法により導入し、37°C で 2~3 日間培養した後共焦点レーザー顕微鏡にて cPLA₂-EGFP 発現の有無とその強度を観察した。その結果、野生型 cPLA₂-EGFP および S505A cPLA₂-EGFP の RAW264.7 細胞における発現が観察されたが、色々と条件を変えて検討を行ったものの、十分なレベルの発現を得ることは出来なかった (図 5)。

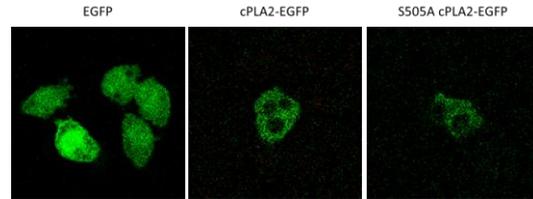


図 5

そこで、GFP タンパクの発現に適した CHO-K1 細胞を用いて、この細胞に野生型 cPLA₂-EGFP 発現ベクターをリポフェクション法により導入を試み、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行ったところ、cPLA₂-EGFP 発現ベクター導入 CHO-K1 細胞において cPLA₂-EGFP の発現が確認された (図 6)。この細胞では、10 mM ionomycin 単独、または 10 mM ionomycin + 1mM CaCl₂ の刺激により、cPLA₂-EGFP 蛋白の核膜周辺への移行が観察された (図 6)。

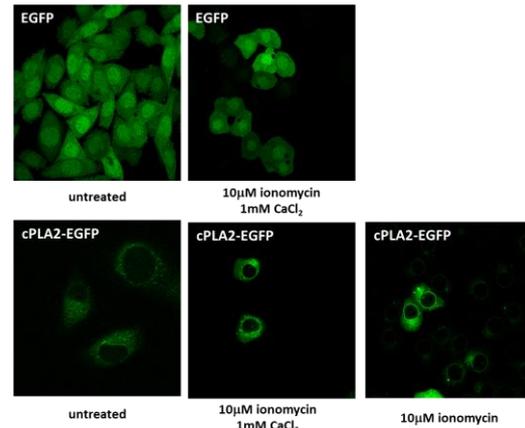


図 6

② CD14, Fc γ R および CD18 遺伝子の CHO-K1 細胞への導入

CHO-K1 細胞への抗酸菌の感染性を高める目的で、CHO-K1 細胞の細胞膜に抗酸菌のマクロファージ内への internalization にレセプターとして働くと考えられている CD14, Fc γ R および CD18 を発現させるべく検討を行った。CD14 または Fc γ R 遺伝子を組みこんだプラスミドベクターを導入した CHO-K1 細胞での CD14, Fc γ R 蛋白の発現を、各々抗ヒト CD14 抗体および抗ヒト Fc γ R 抗体を用いた間接蛍光抗体法で染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行ったところ、図 7 に示す如く、これらの蛋白の CHO-K1 細胞での発現が観察さ

れた。また, hCD18 発現ベクターを導入 CHO-K1 細胞においても, 抗ヒト CD18 抗体を用いた イムノブロッティング法により hCD18 の発現 が認められた (図 8)。現在, これらの蛋白を 発現させた CHO-K1 細胞に cPLA₂-EGFP 発現プ ラスミドベクターを導入し, 発現させるため の試みを進めており, このモデル系の確立を 待って, 抗酸菌感染 CHO-K1 細胞内での cPLA₂-EGFP の細胞塊移行と活性化のプロフ ィールを詳細に検討する予定である。

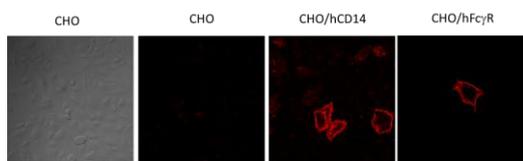


図 7

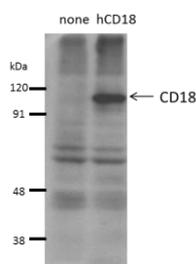


図 8

(4) アポトーシスに連動したマクロファージ殺菌能の増強

① 早期アポトーシスの誘導

THP-1 マクロファージに, MAC を感染させ 24 時間培養した場合, マクロファージの Annexin V との反応性に変化はみられなかつた。他方, 非感染マクロファージをピコリン酸処理した場合には, Annexin V との反応性の増強, すなわちマクロファージ細胞膜の inner layer に発現している phosphatidylserine の細胞膜の outer layer (細胞表面) への表出という現象が起こることが明らかになった。なお, MAC 感染マクロファージにピコリン酸処理を行った場合の Annexin V 反応性の増強は, ピコリン酸処理単独の場合と同程度であった。

以上の結果より, THP-1 マクロファージをピコリン酸処理することにより, 早期アポトーシスが誘導されることが明らかになった。

② 中・後期アポトーシスの誘導

THP-1 マクロファージを上記の条件下で 4 日間培養した場合のアポトーシスの有無を DNA laddering 法で測定したところ, シクロヘキシミドでアポトーシスを誘導したマクロファージでは, 培養 6 時間の時点で DNA のヌクレオソームへの分解による DNA laddering が認められたが, ピコリン酸処理マクロファージや MAC 感染マクロファージではそのような明確な DNA laddering は認められなかった。従って, ピコリン酸で処理した

THP-1 マクロファージでは早期アポトーシスの誘導は起こるものの, 中・後期のアポトーシスに特徴的な DNA 断片化のプロセスまでは進行しないものと考えられる。

③ マクロファージに効率的なアポトーシスを誘導する実験系の確立

マクロファージに対するアポトーシス誘導剤として, etoposide, ATP, TNF- α , Fas ligand, α -(trichloromethyl)-4-pyridineethanol (PETCM) および forskolin を用いて, J774.1 マクロファージにアポトーシスが誘導されるか否かについて検討したところ, マクロファージを etoposide 存在下で 48 時間培養することにより, アポトーシスが誘導されることが分かったが (図 9), この場合, etoposide 処理マクロファージにはアポトーシスに連動した形での *M. smegmatis* 殺菌作用が認められた (図 10)。

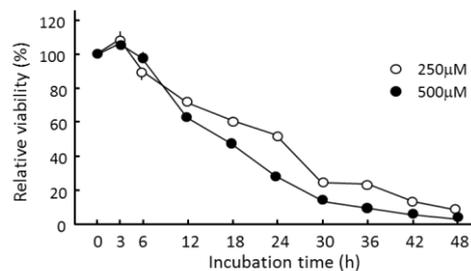


図 9

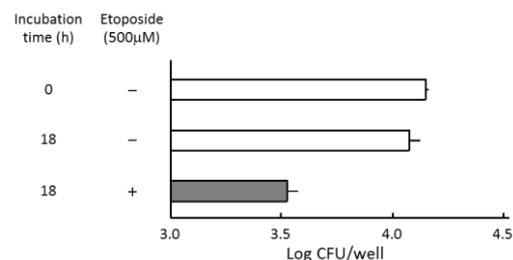


図 10

然しながら, 同じ濃度の etoposide は *M. smegmatis* そのものに対しても殺菌能を示すので, 上記の現象が真にマクロファージのアポトーシスに連動した殺菌能を意味するのか否かは不明である。なお, TNF- α , Fas ligand, caspase-3 活性の増強を惹起してアポトーシスを誘導する PETCM, さらに細胞内 cAMP の増加を介してアポトーシスを誘導する forskolin を用いて, J774.1 マクロファージにアポトーシスを誘導することが出来るかどうかについて検討したが, いずれもそのような作用を示さなかった。

次に, これまで MAC を用いた実験では, ATP による宿主マクロファージのアポトーシスの誘導と細胞内 MAC に対するマクロファージ殺菌能の増強作用との間の連動性を検証することは困難であったが, 図 11 に示すように, zymosan A 誘導マウス腹腔マクロファ-

ジをATP存在化で一定時間培養することにより、アポトーシスの経時的な誘導に連動して、マクロファージの *M. smegmatis* 殺菌能が増強していくことが明らかになった。このモデル実験系は、今後、アポトーシスに連動したマクロファージ殺菌能の増強と言う現象に cPLA₂ がどのような形で関与しているのかについて検討を進める上で、非常に有用と考えられる。

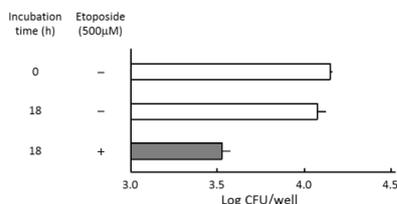


図 11

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 18 件)

- ① Sano C, Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H, et al. Comparative in vitro and in vivo antimicrobial activities of sitafloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin against *Mycobacterium avium*. *Int J Antimicrob Agents*. 査読有り, 37, 2011, 296-301
- ② Tomioka H, Tatano Y, Sano C, Shimizu T. Development of new antituberculous drugs based on bacterial virulence factors interfering with host cytokine networks. *J Infect Chemother*, 査読有り, 2011 (in press)
- ③ Tatano Y, Yasumoto K, Shimizu T, Sano C, Tomioka H, et al. Comparative study for the virulence of *Mycobacterium avium* isolates from patients with nodular-bronchiectasis- and cavitary-type diseases. *Eur J Clin Infect Dis*, 査読有り, 29, 2010, 801-808
- ④ Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H. Properties of immunosuppressive macrophages generated by *Mycobacterium intracellulare* infection in *M. intracellulare*-susceptible and -resistant mice. *New Microbiologica*, 査読有り, 33, 2010, 87-91
- ⑤ Shimizu T, Yasumoto K, Tatano Y, Tomioka H, Sano C, et al. In vitro drug susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG Connaught and Tokyo strains. *J Infect*, 査読有り, 60, 2010, 248-255.
- ⑥ Sano C, Yasumoto K, Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H. Roles of cytoplasmic phospholipase in expression of the antimicrobial activity of host macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Shimane Journal of Medical Science*, 査読有り, 27, 2010, 17-24
- ⑦ Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H. Properties of two-type subpopulations of immunosuppressive macrophages generated by *Mycobacterium intracellulare* infection. *Shimane J Med Sci*, 査読有り, 26, 2009, 1-7
- ⑧ Dimova V, Tomioka H, Sano C, et al.:

Experimental and clinical studies on rifacunna -The new effective antituberculous drug-. *Recent Patents on Anti-Infect Drug Discov*, 査読有り, 5, 2009, 76-90, 2009.

⑨ Tomioka H, Tatano Y, Yasumoto K, Shimizu T. Recent advances in antituberculous drug development and novel drug targets. *Expert Rev Respir Med*, 査読有り, 2, 2008, 455-471

⑩ Tomioka H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Expert Opin Drug Discov*, 査読有り, 3, 2008, 1-29

[学会発表] (計 58 件)

① 富岡治明, 【教育講演】抗結核薬開発の現状と展望—新しい drug target の探索, 第 85 回日本結核病学会総会, 2010 年 5 月 21 日, 京都

[図書] (計 4 件)

- ① Tomioka H. Prospects for the development of new antituberculous drugs based on novel targets related to the host-parasite relationship in tuberculosis. *In: Emerging Trends in Antibacterial Discovery*. A.A. Miller, P.F. Miller (ed.), pp.241-279, Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 2011 (in press)
- ② Tomioka H: Immunology of Leprosy - Roles of Cytokines in Host Defense against Leprosy Bacilli. *In: Leprosy*, M. Makino, et al (ed.), pp.72-88, Tokai University Press, Kanagawa, Japan. 2011.
- ③ Tomioka H: Suppressor macrophages induced by mycobacterial infections. *In: Current Topics on the Profiles of Host Immunological Response to Mycobacterial Infections*, H. Tomioka (ed.), pp.251-280, Research Signpost, p.251-280, Kerala, India, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 治明 (TOMIOKA HARUAKI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：40034045

(2) 研究分担者

佐野 千晶 (SANO CHIAKI)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号：70325059
(H22)
多田納 豊 (TATANO YUTAKA)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：70432614
清水 利朗 (SHIMIZU TOSHIKI)
安田女子大学・家政学部・准教授
研究者番号：60284030
(H20-H21)
安元 剛 (YASUMOTO KO)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号：00448200
(H20-H21)