

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19009

研究課題名(和文) AxlとMerの双方を必要とするミクログリアの死細胞貪食機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Axl and Mer dependent efferocytosis of microglia

研究代表者

柳橋 祐一 (Yanagihashi, Yuichi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：50611886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ノックアウトマウスを用いた解析により、ミクログリアは受容体型チロシンキナーゼであるAxlおよびMerの双方を用いて死細胞の貪食を行っていることが明らかになっていた。しかし、AxlおよびMerそれぞれの死細胞貪食促進活性やProtein SやGas6といったリガンドの要求性は定量的に評価されていなかった。本研究では、この貪食活性を定量的に評価し、加えて様々なマクロファージとの比較を行うことにより、ミクログリアの死細胞貪食の特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Analysis of Mer deficient mouse revealed that microglia engulfed apoptotic cells through Axl and Mer receptor tyrosine kinase. But, their ability to enhance efferocytosis and requirement of their ligand - Protein S and Gas6 were not quantitatively determined. In this study, microglial efferocytosis was characterized by quantitative analysis of the ability to enhance efferocytosis and comparison between microglia and various macrophages.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Axl Mer 死細胞貪食

1. 研究開始当初の背景

TAM レセプターは Tyro3, Axl, Mer の 3 つからなる受容体型チロシンキナーゼファミリーであり、主なりガンドとして Protein S と Gas6 の 2 つの分子が知られている。これらのリガンドは TAM レセプターに加えて死細胞表面に露出されるホスファチジルセリンにも結合することにより、貪食細胞と死細胞をつなぎ、死細胞の貪食を促進している。

発生期の脳内においては約半数の神経芽細胞がアポトーシスを起こしているが、ミクログリアがこれを速やかに貪食除去することにより炎症反応が起らず、神経回路の正常な形成を可能にしている。この貪食過程において TAM レセプターが関与しているかを明らかにするために Mer のノックアウトマウスから調整したミクログリアに死細胞を貪食させてみたところ、死細胞の貪食能が大きく減弱した。さらに、Axl の阻害抗体を加えると貪食能がほぼ消失した。このことより、ミクログリアは Mer だけでなく Axl も用いて死細胞貪食を行っていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

死細胞の貪食研究においては、Mer に関する報告が多く、Axl や Tyro3 に関する報告はほとんどなかった。そこで、まず TAM レセプターそれぞれの死細胞貪食能に対する影響や、リガンド特異性等を明らかにする。それらをもとに、ミクログリアの死細胞貪食における分子機構や生体内での役割について研究を行う。

3. 研究の方法

TAM レセプターとリガンドである Protein S および Gas6 との解離定数を測定することにより、リガンドとレセプターの間の結合の強さを明らかにする。加えて、Axl、Tyro3、Gas6 をノックアウトすることにより、貪食能を失った NIH3T3 細胞に TAM レセプターそれぞれを 1 つずつ導入することにより、Tyro3、Mer、Axl それぞれの貪食活性を定量的に評価する。また、種々のマクロファージと TAM レセプターの発現量や貪食活性等の比較を行うことにより、ミクログリアの死細胞貪食機構を調べる。

4. 研究成果

(1) TAM レセプターのリガンドである Protein S および Gas6 を FLAG タグを付加した組み換え体として HEK293T 細胞より調整した。Protein Lipid Overlay 法および ELISA 法を用いてこれらの脂質結合活性を測定すると、カルシウム依存的にホスファチジルセリンと特異的に結合し、その結合活性はホス

ファチジルセリン結合タンパク質として知られている MFG-E8 や Tim4 と比べると 2-8 倍弱いものであった。また、これらのリガンドを superdex200 を用いてその動態を確認したところ、約 190 kDa 付近に単一のピークが確認された。SDS-PAGE によると Protein S および Gas6 は 7-80 kDa 付近にバンドが確認されることから精製した Protein S および Gas6 は主として二量体を形成していることが示唆された。

(2) TAM レセプターの細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 領域との融合タンパク質を調整し、上記の組み換え体リガンドとの解離定数を SPR 法及び BLI 法で測定した。その結果、Axl-Gas6 間の結合は、解離定数が 0.6-0.8 nM と非常に強いものであったが、Axl-Protein S 間では結合が認められなかった。一方で、Mer および Tyro3 と Protein S および Gas6 との結合は解離定数が 15-50 nM と同じような強さであったが、Mer は Gas6 と Tyro3 は Protein S とより強く結合していた。また、SPR 法及び BLI 法で測定した解離定数の間には多少の差異 (1.5 倍程度) はあったが、概ね同様の値を示していた。

(3) 貪食活性をもたない Axl、Tyro3、Gas6 トリプルノックアウトした NIH3T3 細胞に TAM レセプターそれぞれを 1 つずつ導入し、貪食活性を測定したところ、Axl を発現した細胞では Protein S を添加しても貪食活性は示さなかったが、Gas6 を添加した場合には非常に強い貪食活性を示した (EC50 = 0.1 nM)。これは Axl と Protein S と Gas6 の結合を測定した結果とよく一致するものであったが、EC50 の値は解離定数の値よりも 5 倍ほど低い値となった。これはホスファチジルセリンと結合した TAM リガンドが多量体を形成することにより、より強くシグナル系を活性化している結果であると考えられる。また、Mer と Tyro3 を発現させた細胞ではリガンドとの結合を測定した結果と同様に、比較的マイルドな貪食活性を示し、EC50 の値に関しては Axl-Gas6 と同様に解離定数より数倍低い値を示した。

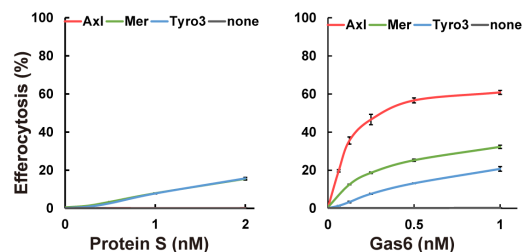


図 1 TAM レセプター依存的な死細胞貪食活性

(4) 初代培養したミクログリアにおいて TAM レセプター及びそのリガンドの発現をリアルタイム PCR 法を用いて確認すると Mer と比

べて Axl の発現は弱いものであった。一方で、LPS 等の炎症性の刺激を与えると Mer の発現が低下し、Axl の発現が増加することが報告されている。このことより、通常状態では Mer を用いて死細胞貪食を行っているが、炎症状態のような死細胞が大量に発生する状況下ではより貪食活性の強い Axl を用いて死細胞の貪食を行っているのではないかと推測された。また、リガンドの発現においては、Gas6 が強く発現している一方で、Protein S はほとんど発現していなかった。これより、ミクログリアは Protein S ではなく、主として Gas6 を用いて死細胞の貪食を行っていることが示唆された。

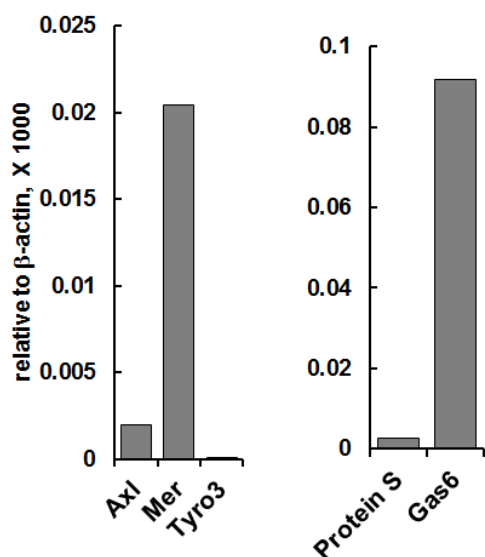


図2 ミクログリアにおける TAM レセプターおよびリガンドの発現

(5) 腹腔常在性マクロファージにおいてはホスファチジルセリン結合タンパク質である Tim4 が死細胞を捕捉し、Mer と協調して死細胞の貪食を行っていることが知られている。このことから、初代培養したミクログリアにおいてその発現を調べたところ、発現は認められず、Tim4 ノックアウトマウスから調整したミクログリアの死細胞貪食能は野生型のものと同色なかつた。このことより、初代培養したミクログリアにおいては、死細胞を保持する他の分子が存在している可能性または死細胞を保持しなくても貪食できる機構を用いている可能性が示唆された。一方で、マウスの脳の切片を作成し、抗 Tim4 抗体と抗 Iba1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、脳の限られた領域でのみ両方が共発現している細胞が確認された。このことより、脳内の貪食細胞は一様ではなく多様性を持っていることがあきらかになった。

(6) Tim4 を発現した細胞と発現していない細胞の機能的差異を明らかにするために、上述の TAM レセプターを導入した細胞に Tim4 を発現させることにより Tim4 の死細胞貪食

における役割を定量的に評価したところ、Tim4 は Protein S および Gas6 の必要量 (EC50) を 1 桁から 2 桁低下させることが明らかになった。このことより、Tim4 発現細胞は Protein S や Gas6 が少ない状況下でも死細胞を効率よく貪食できることが示唆され、炎症状態ではなく常状態において、死細胞を貪食し炎症を抑える方向に働いていることが示唆された。実際、炎症性のマクロファージである腹腔滲出性マクロファージでは Tim4 は発現していないが、皮膚の CD169+マクロファージや肝臓のクッパー細胞といった常在性マクロファージでは Tim4 が発現しており、死細胞の貪食に必要なことが確認されている。以上の結果より、少なくとも初代培養したミクログリアにおいては、炎症性のマクロファージ用の性格を色濃く持った細胞であることが示唆された。

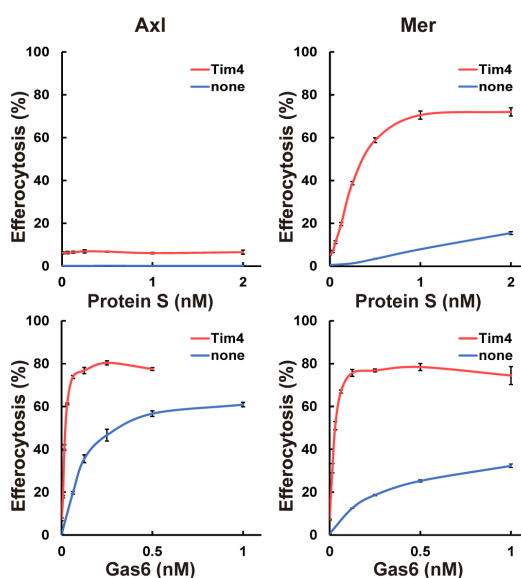


図3 Tim4 の TAM レセプター依存的死細胞貪食に及ぼす影響

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)

Toda S, Nishi C, Yanagihashi Y, Segawa K, Nagata S. (2015) Clearance of Apoptotic Cells and Pyrenocytes. *Curr Top Dev Biol*, 114:267-95.

[学会発表](計 0 件)

[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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochemi.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳橋 祐一 (YANAGIHASHI, Yuichi)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任研究員
研究者番号：50611886

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()