

令和元年6月11日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08148

研究課題名(和文) 神経調節因子の自然免疫系における役割の解明

研究課題名(英文) The role of neuromodulatory factors in innate immune system

研究代表者

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI, Takato)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：20292518

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)：神経調節因子として知られるジアゼパム結合阻害因子(DBI)と中脳アストロサイト由来神経栄養因子(MANF)について、自然免疫担当細胞であるマクロファージからの産生・分泌機構を解析するとともに、自然免疫応答調節作用について検討した。ATP刺激したマクロファージからのDBI・MANFの分泌機構には、P2X7受容体を介した非典型的分泌機構の関与が示唆された。また、ブレビバチルス菌を用いた組換え蛋白質作製法を利用して、両因子を菌体外に分泌・生産するシステムを構築した。さらに、作製した組換えMANFの生理活性についてマウスを用いて検討したところ、抗炎症性の作用を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経系の調節因子として知られていたジアゼパム結合阻害因子(DBI)と中脳アストロサイト由来神経栄養因子(MANF)の生体内での役割について、神経系における作用だけでなく、自然免疫系においても調節因子として機能している可能性を示した。また、ブレビバチルス菌を用いた組換え蛋白質作製法が、両因子の分泌型蛋白質を生産するために非常に有効であることを初めて示した。組換えMANFに抗炎症性の作用が認められたことから、その産生・分泌に関わる制御機構が、抗炎症薬など薬剤開発のための新たなターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the secretory mechanisms of DBI and MANF from macrophage-lineage cells, and evaluated the immunomodulatory functions of these neuromodulatory factors in innate immune system. It was demonstrated that DBI and MANF are secreted from macrophages via P2X7 receptor-mediated unconventional secretion pathway. We also established the production system for recombinant proteins of DBI and MANF using Brevibacillus expression system. These factors are produced as secreted proteins in the culture supernatant of brevivacillus transformants. Based on the actions of recombinant MANF in macrophages, we propose the idea that MANF plays an anti-inflammatory role in mice.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：自然免疫応答 神経調節因子 マクロファージ 非典型的分泌機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳常在性マクロファージであるミクログリアは、脳内の自然免疫応答に中心的に関与する細胞である。種々の刺激に反応して栄養因子やサイトカイン等を産生・分泌し、死細胞の除去や神経保護など脳の恒常性維持に寄与する。一方で、異常に活性化されたミクログリアは神経細胞に対し傷害性を示す二面性を持っており、様々な神経変性疾患発症の原因にもなると考えられている。

申請者らは、ATP 刺激によってミクログリア細胞株から細胞外に分泌される蛋白質を網羅的に解析 (セクレトーム解析) した結果、神経系の調節に関わる二つの脳内生理活性因子、ジアゼパム結合阻害因子 (DBI: Diazepam binding inhibitor) と中脳アストロサイト由来神経栄養因子 (MANF: Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) が ATP 刺激されたミクログリアから積極的に分泌されることを新しく見出した。DBI と MANF は、主に神経細胞やアストロサイトで産生・分泌されると考えられてきたため、ミクログリアからの分泌制御については未解明であった。

また ATP は、傷害を受けた細胞から大量に細胞外へ放出されることから、生体の危険を伝達する内因性の危険信号分子 (アラミン) として知られる。加えて、ATP 刺激でマクロファージ系細胞から分泌される細胞内蛋白質には、自然免疫応答の調節因子として機能するものが多い。実際に、申請者がミクログリアで行った ATP 刺激後のセクレトーム解析でも、HMGB1 や S100 蛋白質といった既にアラミンとして認知されている蛋白質が検出されてきた。これらのことから、DBI や MANF も自然免疫応答の調節因子として重要な機能を持つのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、神経調節因子として知られる DBI と MANF の自然免疫系における役割を明らかにすることを目的とする。具体的には、これら二つの因子について、マクロファージ系細胞からの産生・分泌制御機構を解析するとともに組換え蛋白質を作製して自然免疫応答調節作用を検討した。

3. 研究の方法

- (1) マクロファージ細胞株: マウスマクロファージの不死化細胞株として、脳ミクログリア由来 MG6 細胞、腎臓系球体マクロファージ由来 KM-1 細胞を用いた。
- (2) DBI・MANF の検出: 両因子に対する市販の抗体を利用して、ウエスタンブロット (WB) 法により蛋白質レベルでの発現を調べた。
- (3) マクロファージからの分泌実験: マクロファージ細胞を 24 穴プレートに播種し、各種リガンドで刺激した後、培養上清に分泌される内因性の DBI と MANF を WB 法で検出した。
- (4) 細胞外小胞マイクロベシクル/エクソソームの関与: ATP 刺激後の培養上清に含まれるマイクロベシクル (粒径 100~1000nm) を 10,000g の遠心法で回収した。エクソソーム (粒径 30~200nm) は単離キットを用いて培養上清から回収し、マーカー蛋白質 (HSP70、CD9 など) の局在を確認した。
- (5) 組換え蛋白質の作製: プレバチルス菌を用いた組換え蛋白質作製法 (BIC 法) を用いて DBI・MANF の組換え蛋白質を作製した。
- (6) マウスへの投与実験: 組換え MANF 蛋白質を腹腔内あるいは静脈内に投与したマウスより回収した免疫系細胞を用いて、炎症性の刺激に対する効果を検討した。

4. 研究成果

- (1) マクロファージ系細胞からの DBI・MANF の分泌機構: ATP 刺激による MG6 細胞からの DBI の分泌は、リポ多糖 (LPS) の前処理で促進され (図 1 A)、P2X7 受容体 (P2X7R) アンタゴニスト (A438079 及び oxATP) で抑制された (図 1 B)。ATP 刺激による KM-1 細胞からの MANF 分泌も LPS の前処理で促進され (図 2 A)、分泌された MANF は主にマイクロベシクルに局在していた (図 2 B)。また、P2X7R アゴニストのみ (ATP と BzATP) で MANF 分泌が誘導され (図 2 C)、P2X7R アンタゴニスト (A438079、BBG、oxATP) では分泌が抑制された (図 2 D)。これらの結果から、マクロファージ系細胞からの DBI・MANF の分泌には P2X7R を介した非典型的分泌機構の関与が示唆された。

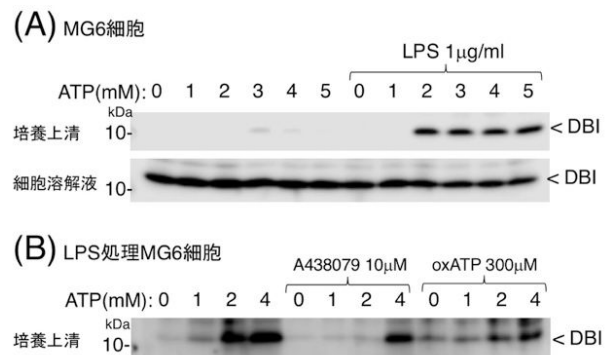


図 1 DBIのATP刺激による分泌 (A) とP2X7Rアンタゴニストによる分泌抑制 (B)

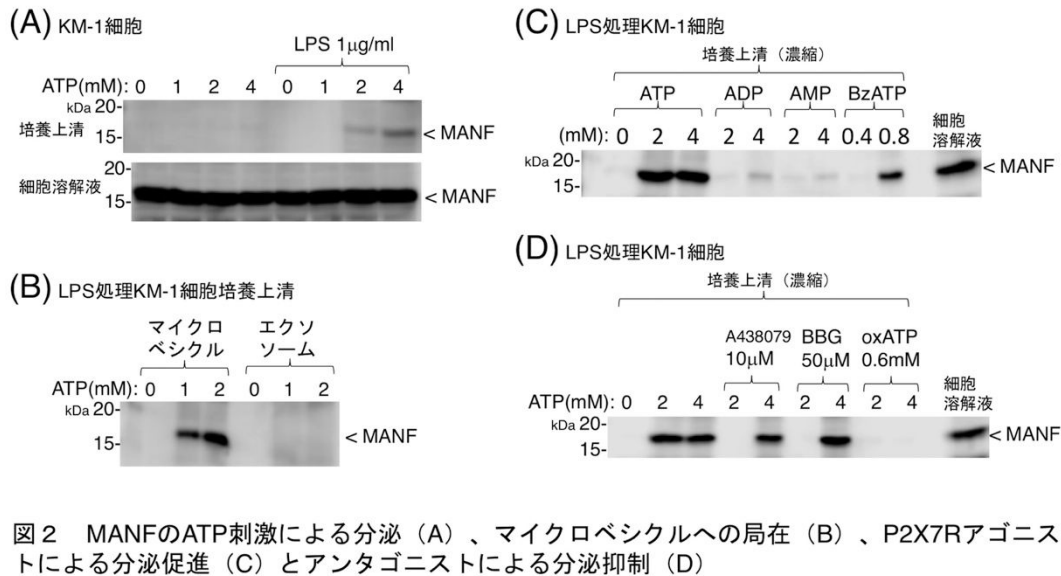


図2 MANFのATP刺激による分泌 (A)、マイクロベシクルへの局在 (B)、P2X7Rアゴニストによる分泌促進 (C)とアンタゴニストによる分泌抑制 (D)

(2) BIC 法による組換え MANF 及び DBI 蛋白質の作製: BIC 法は、組換え蛋白質を菌体外に分泌・生産できるため、細胞外で機能する生理活性因子の作製に適している。本研究では、マウス由来の両因子を培養液中に分泌するプレバチルス菌クローンの作製に成功した。培養液中からは His タグを利用した精製の後 (図 3 A) 透析及びセントリコンによる濃縮を行うことで、高純度でかつ mg/ml という比較的高濃度で両蛋白質溶液を調製できることを示した (図 3 B、図 4 A)。作製した組換え蛋白質は、抗 DBI (図 3 C) あるいは抗 MANF (図 4 B) 抗体を用いた WB 法で確認された。30~60ml の培養液から 1mg 程度の両蛋白質を生産できることがわかった。

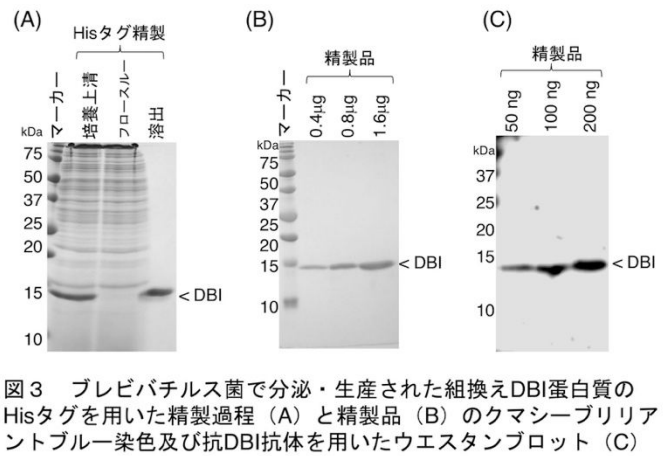


図3 プレバチルス菌で分泌・生産された組換えDBI蛋白質の Hisタグを用いた精製過程 (A) と精製品 (B) のクマシーブリリアントブルー染色及び抗DBI抗体を用いたウエスタンブロット (C)

(3) 組換え MANF の生理活性: BIC 法で作製した組換え MANF の生理活性について、KM-1 細胞に対する作用を検討した。LPS 及び ATP で KM-1 細胞を刺激すると炎症性サイトカイン IL-1 の放出が誘導されるが、組換え MANF で前処理した細胞では、その IL-1 放出が抑制される傾向が見られた。また、組換え MANF を静脈内投与したマウスから調製した腹腔マクロファージを LPS 及び ATP で刺激した場合にも、IL-1 の放出が抑制されることがわかった。これらの結果から、MANF が抗炎症性の作用を持つことが示唆された。現在、脾臓 T 細胞への組換え MANF の作用についても検討を行っているところである。

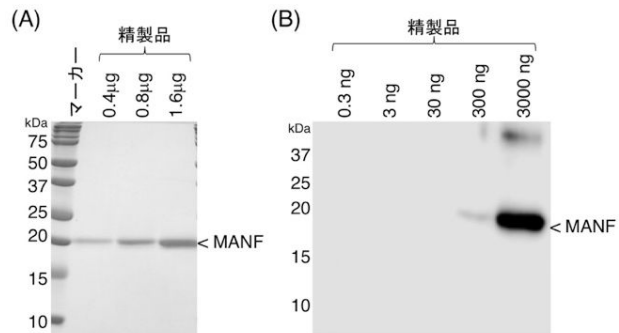


図4 プレバチルス菌で分泌・生産された組換えMANF蛋白質精製品のクマシーブリリアントブルー染色 (A) 及び抗MANF抗体を用いたウエスタンブロット (B)

今後、組換え MANF あるいは DBI の *in vivo* 投与の効果についてマウスを用いて研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Takato Takenouchi, Hiroshi Kitani, Shunichi Suzuki, Michiko Nakai, Dai-ichiro Fuchimoto, Mitsutoshi Tsukimoto, Hiroki Shinkai, Mitsuru Sato, Hirohide Uenishi (2017) Immortalization and

characterization of porcine macrophages that had been transduced with lentiviral vectors encoding the SV40 Large T antigen and porcine telomerase reverse transcriptase. *Front. Vet. Sci.* 4:132 (査読有) DOI: 10.3389/fvets.2017.00132

竹之内敬人、吉岡都、木谷裕、山中典子 (2016) マクロファージの簡便な大量回収法とその利用、*ケミカルエンジニアリング*、61:510-515 (査読無)

[学会発表] (計 3 件)

箱田公樹、竹之内敬人、木谷裕、月本光俊、腎マクロファージにおける P2X7 受容体活性化による免疫調節因子の放出、日本薬学会第 138 年会、2018 年

竹之内敬人、木谷裕、鈴木俊一、中井美智子、淵本大一郎、月本光俊、新開浩樹、佐藤充、上西博英、ブタマクロファージ不死化細胞株の樹立と特性解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

箱田公樹、竹之内敬人、木谷裕、月本光俊、腎マクロファージにおける P2X7 受容体活性化による免疫調節因子の放出、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年

[その他]

竹之内敬人、木谷裕、鈴木俊一、中井美智子、淵本大一郎、月本光俊、新開浩樹、佐藤充、上西博英、ブタマクロファージの新しい不死化法 (2017 年) 農研機構・研究成果情報 : http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/4th_laboratory/nias/2017/nias17_s15.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 月本 光俊

ローマ字氏名 : (TSUKIMOTO Mitsutoshi)

所属研究機関名 : 東京理科大学

部局名 : 薬学部薬学科

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 70434040

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 岩丸 祥史

ローマ字氏名 : (IWAMARU Yoshifumi)