

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11574

研究課題名(和文) 漏出細胞内タンパク質の新しい細胞外機能：受容体を共有する単球・内皮での役割と作用

研究課題名(英文) Extracellular function of leaked intracellular proteins: role and action in receptor-sharing monocytes and endothelial cells

研究代表者

泉 友則 (IZUMI, Tomonori)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00261694

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)：組織損傷にともない、様々な細胞内タンパク質が漏出するが、細胞外での機能的意義の多くは不明である。我々は、これまでに、単球への作用を示す新しい細胞外機能分子を同定した。急性期の血管内イベントにおける本機能分子の役割を明らかにするために、内皮細胞への影響を解析した。ヒト血管内皮細胞を用いた培養実験において、単球・内皮間の相互作用や内皮細胞同士の接着に対する機能分子の明らかな影響は見られなかった。一方、内皮細胞の運動性は顕著に上昇し、本機能分子が単球のみならず血管内皮へも作用することが明らかとなった。これは、損傷組織からの漏出タンパク質が急性期の炎症や組織修復に直接関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、既知の細胞内タンパク質が、細胞外では予想外の新しい役割を果たしていることが明らかとなった。急性期病態という観点からは、組織損傷により漏出した細胞内タンパク質が、血管内での炎症や組織修復などに直接作用していることを示しており、病態を左右する新たな機序のひとつになるかもしれない。漏出細胞内タンパク質の役割を新たな軸のひとつとしてとらえ、血管内イベント全体についての理解が進めば、病態のモニターや新しいタイプの創薬ターゲットとして、臨床への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Various intracellular proteins are leaked from the damaged tissue. However, significance of their extracellular function remains largely unknown. We have previously identified a novel extracellular functional molecule that exerts an action on monocytes. To clarify the role of this functional molecule in intravascular events in the acute phase, the effect on endothelial cells was analyzed. In the cell culture experiment using human vascular endothelial cells, no clear effect of functional molecules on the interaction between monocytes and endothelium or the adhesion between endothelial cells was observed. On the other hand, the motility of endothelial cells was markedly increased, and it was revealed that this functional molecule acts not only on monocytes but also on vascular endothelium. This suggests that proteins leaked from damaged tissues are directly involved in acute inflammation and tissue repair.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞質漏出 血管内皮 組織修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで、独自の高性能大規模タンパク質解析技術を利用して、中枢神経障害を中心とした救急領域の疾患プロテオーム解析を進めてきた。蘇生後脳症患者脳脊髄液より同定されたタンパク質のうち、3割以上を細胞内タンパク質が占め、新規に同定された蘇生後脳症予後判定マーカーについては、細胞外での新たな分子機能も見出された。このように病態と関連し細胞外へ漏出した細胞内タンパク質には、病態悪化、あるいは生理的な防御・修復への関与も想定されるが、大多数のバイオマーカーについては、その分子機能の病態への影響は見過ごされていた。

(2) 組織損傷時に漏出する細胞内タンパク質の新たな役割が注目されている。細胞外で機能するタンパク質を網羅的に探索するために、単球表面への結合を指標とした選択的プロテオーム解析技術を開発し、168種類の細胞内タンパク質を「潜在的な細胞外機能分子」として同定した。その一つは新規のシグナル分子活性を示し、さらに相互作用解析により同定した単球受容体は、接着・運動での役割が知られていたが、受容体自身の発現は、内皮でも報告されていた。

(3) 果たして単球へ作用する細胞外機能分子が他方で影響を及ぼす内皮の機能とはいったい何なのか？細胞外機能分子が内皮の表面特性や透過性に与えるインパクトを解析することで、急性期病態の血管内イベントを単球・内皮の両面から俯瞰することが可能となり、漏出タンパク質の炎症やショックにおける複合的な役割と創薬ターゲットとしての有用性を明らかにできるのではとの考えに至った。

2. 研究の目的

(1) 組織損傷時に放出される細胞内タンパク質の内皮細胞に対する機能的な意義を理解するためには、急性期の血管内で進行する「白血球の接着・遊走、血管透過性の亢進、血液凝固反応の亢進」のどれが主要な標的であるかを特定し、さらにその効果が善玉であるか悪玉であるかを明らかにする必要がある。本細胞外機能分子をヒト臍帯静脈内皮細胞の培養系に添加し、単球系細胞株・内皮間の相互作用、内皮どうしの細胞間結合、内皮の細胞運動、内皮表面での凝固反応、それぞれに与える細胞外機能分子の影響を解析する。特定した標的作用について関連する分子機序を調査し、この細胞外機能分子の内皮細胞に対する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、コラーゲンコートしたシャーレを使用し、無血清培地(Cell Systems Com)にて培養した。ヒト単球系細胞株として、U937、HL60、およびTHP-1を使用し、血清を含むRPMI培地にて、常法に則って培養した。

(2) 内皮細胞の増殖および細胞間結合に対する細胞外機能分子の影響

コラーゲンコートした96穴マイクロプレート上にHUVECを播種後、細胞外機能分子(最終濃度 ~ 0.1 mg/ml)を添加した、あるいは無添加の新鮮培地中でHUVECを継代し、経時的にコロニー数、およびコロニー構成細胞数を計測した。細胞間結合への影響は、増殖過程での細胞密集度と細胞形態を考慮し評価した。

(3) 内皮受容体を介した単球の細胞接着

コラーゲンコートした96穴マイクロプレート上にHUVECを播種し、サブコンフルエント状態になるまで培養した。培地交換後、TNFa(10 ng/ml)存在下、および非存在下でさらに24時間培養し、実験に使用した。単球の細胞接着実験は、細胞株U937、HL60、およびTHP-1を細胞外機能分子(0.1 mg/ml)とともにHUVECへ添加し、接着細胞数をカウントした。

(4) 内皮表面の抗凝固性に対する細胞外機能分子の影響

コラーゲンコートした96穴マイクロプレート上にHUVECを播種し、サブコンフルエント状態になるまで培養した。培地交換後、TNFa(10 ng/ml)存在下、および非存在下でさらに24時間培養し、培地を除去後、細胞外機能分子を添加し、15分間インキュベーションした。上清を除去後、クエン酸加ヒト血漿、次いで25 mM CaCl₂を添加し、生成したフィブリン重合体の量を濁度の変化としてマイクロプレートリーダー(吸光度405 nm)により経時的に測定した。コントロール実験として、熱変性させた細胞外機能分子の使用、およびHUVECなしでの測定を行った。

(5) 内皮細胞の運動性に対する細胞外機能分子の影響

内皮細胞の運動性はスクラッチアッセイにより解析した。コラーゲンをコートした24穴培養プレート上にHUVECを播種し、サブコンフルエント状態になるまで培養した。接着したHUVECの一部をプラスチックチップにて剥離させ(長さ1 cm x 幅1 mm)、培地とともに除去・洗浄を行った後、細胞外機能分子を添加(0.1 mg/ml)した新鮮培地を加え、37℃、5% CO₂の条件で培養を開始した。剥離直後、8時間後、および24時間後の細胞を撮影し、剥離面に移動した細胞集団の面積を計測した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞の増殖および細胞間結合に対する細胞外機能分子の影響

急性期病態で見られる血管内皮透過性の亢進に関して、細胞外機能分子の影響を検討した。細胞外機能分子の培地への添加は、内皮細胞の増殖に影響を与えなかった。また、増殖過程のコロニー数や細胞密集度、細胞形態に変化は見られず、検討した細胞外機能分子の濃度範囲では、血管透過性の調節に関わる内皮の細胞間結合に影響を与えなかった。

(2) 内皮受容体を介した単球の細胞接着

細胞外機能分子に対する表面受容体は、単球、内皮、それぞれ発現していること、また細胞外機能分子が四量体構造をとることから、この細胞外機能分子が炎症初期の単球-内皮間細胞接着に関与する可能性について検討した。TNF α 処理した内皮表面に単球は速やかに接着した。細胞外機能分子とともに添加した単球は、やはり速やかに単球に接着し、両条件で接着細胞数に明らかな違いは見られなかったことから、本細胞外機能分子は、単球-内皮間細胞接着に影響を及ぼさないと考えられた。

(3) 内皮表面の抗凝固性に対する細胞外機能分子の影響

内皮表面の抗凝固性の破綻は DIC を惹起し、急性期病態の重症度や予後を大きく左右する。本細胞外機能分子に凝固反応への直接的な作用を想起させる特徴はないが、例えば抗リン脂質抗体症候群や抗凝固因子抗体で見られるような細胞膜上へのタンパク質結合は、タンパク質巨大複合体による立体障害により、周囲の適切な凝固・抗凝固反応の阻害、リン脂質組成の攪乱などを惹き起こし、内皮細胞の表面特性を変化させる。そこで、内皮細胞の抗凝固性への影響について検討した。HUVEC のみの結果と比較して、事前に細胞外機能分子を結合させた HUVEC は、凝固時間延長、および反応速度低下の傾向を示した。一方、TNF α 処理した HUVEC では、未処理に比べて高い凝固活性を示したが、細胞外機能分子による凝固反応への明らかな影響は見られなかった。これは、細胞外機能分子の細胞表面への結合は、平常時の内皮細胞に関して、抗凝固性を維持する側に働くが、急性期の炎症状態においては、その効果はない、あるいは限定的であることを示していた。

(4) 内皮細胞の運動性に対する細胞外機能分子の影響

細胞外機能分子に対する単球上の受容体が細胞接着・運動に関わる可能性があること、さらに、組織損傷後の修復過程における血管新生においては、内皮細胞の運動が重要であることから、内皮細胞の運動性に対する細胞外機能分子の影響をスクラッチアッセイにより解析した。剥離から 12 時間後、コントロール条件の HUVEC は剥離面の約 2/3 (65.9 +/- 4.9 %) に移動していた。一方、細胞外機能分子添加条件では、剥離面のほぼ全体 (97.5 +/- 2.5 %) が HUVEC に覆われていた。この結果は、細胞外機能分子が内皮細胞の運動性を増加させ、損傷時の組織修復を促進していることを示唆していた。

(5) 内皮細胞の運動性にかかわるシグナル経路

以上の結果から、内皮細胞に対する細胞外機能分子の主要な役割は、細胞運動の増強であると結論付けた。本細胞外機能分子とシグナル伝達の関わりは、これまで全く報告されていない。またこの受容体のシグナル伝達における役割については、限られた数の報告があるのみで、細胞外ドメインを介したマトリックスタンパク質との結合、細胞内ドメインとアダプターを介したアクチン繊維への結合が知られている。Src や Cbl を介したシグナル伝達と細胞運動への関与も近年報告されており、我々も、単球においては、本細胞外機能分子の添加が MAP キナーゼのリン酸化を増強することを既に確認している。本細胞外機能分子の受容体への結合が本来のシグナル伝達をいかにして調節し、細胞運動性を向上させるかについては、さらなる解析が必要である。

(6) まとめ

本研究により、損傷組織から漏出した細胞内タンパク質が内皮細胞の運動性を増強させることが明らかになった。この細胞外機能分子は、内皮とともに単球へも作用することから、組織損傷時の血管内イベントに多面的に影響を及ぼしていると考えられる。これまでに報告されている「細胞外で機能する細胞内タンパク質」は、HMGB1などを代表とする、限られた数のタンパク質のみである (Scaffidi ら、Nature、2002)。一方、我々は、細胞表面結合能を有する細胞内タンパク質として、これまでに 168 種類の潜在的な細胞外機能分子を特定している。主に組織損傷のバイオマーカーとして認知され、臨床検査で利用されているような一連の漏出細胞内タンパク質について、このような細胞外での機能に注目した研究を進めることで、未知の生体調節機構の発見や各種疾患における新たな治療法の開発が十分に期待できる。

< 引用文献 >

Scaffidi, P. et.al, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation, Nature, 418, 2002, 191-195.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mimura Y, Katoh T, Saldova R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, Utsunomiya T, Mizukami Y, Yamamoto K, Matsumoto T, Rudd PM	4. 巻 9
2. 論文標題 Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Cell	6. 最初と最後の頁 47-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13238-017-0433-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 泉友則
2. 発表標題 プロテオーム解析技術の基礎と活用例
3. 学会等名 平成29年度 大学連携研究設備ネットワーク加速事業 プロテオーム解析技術講習会
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	田岡 万悟 (TAOKA Masato) (60271160)	首都大学東京・理学研究科・准教授 (22604)	
連携研究者	前川 剛志 (MAEKAWA Tsuyoshi) (60034972)	山口大学・その他部局等・名誉教授 (15501)	