

令和元年5月30日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15664

研究課題名(和文) プロテオミクスアプローチによるオートファジー関連疾患発症機序の解析

研究課題名(英文) Assay of autophagy-related diseases onset mechanisms with proteomic approach.

研究代表者

印東 厚 (INTOH, Atsushi)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：70779058

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)：オートファジーの働きが弱まると様々な疾患が引き起こされることが知られており、これらを疾患発症の初期段階を補足し得るバイオマーカーの同定が求められている。本研究では刺激性微粒子によって免疫担当細胞が放出するタンパク質群をプロテオミクス解析によって網羅的に同定した。特に、刺激に応じて細胞外レベルが増加する因子のうち、オートファジー不全マウスにおいてさらに増加する因子群を多数同定した。疾患モデルマウスの血中濃度がコントロール群と比べて増加することから疾患バイオマーカー候補であることを示した。また、当該因子が炎症性サイトカイン産生を負に制御していたことから、創薬ターゲットとしても期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは損傷した細胞内小器官を選択的に分解し、細胞の恒常性を維持する機構であり、この働きが弱まると神経変性疾患や炎症性疾患などが引き起こされることが知られている。このオートファジー不全からの疾患発症過程において細胞外レベルが顕著に変動するタンパク質は機能的な重要性だけでなく、関連疾患群の有効なバイオマーカーとなり得る。本研究で明らかにした、刺激性微粒子による細胞小器官の損傷に伴って細胞外へ放出される因子群は、細胞や生体が有する恒常性維持機構の分子機構の解明だけでなく、血中や尿中から安易に採取できる疾患バイオマーカーとしての有効性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a mechanism to digest damaged organelles, and serves an important role to maintain homeostasis of cells and organisms against many diseases. Extracellular proteins released in association with autophagy activity and organelle damages are candidates for the autophagy-related disease biomarkers. In this research, mouse proteomic analyses of released/secreted proteins from immunocompetent cells were performed with or without irritant particle stimulus. By this assay, many biomarker candidates were identified, and some of them are revealed to detect in blood serum and urine from autophagy-disease model mouse. Knock-down assay of the extracellular proteins also showed one of the identified protein negatively control the production of inflammatory cytokines, suggesting the identified protein is expected as a drug target.

研究分野：分子生物学

キーワード：プロテオミクス解析 オートファジー 細胞内小器官 炎症応答 生活習慣病

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

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは劣化したオルガネラやタンパク質を除去する細胞恒常性維持機構であり、オートファジー活性の低下は細胞死や細胞高次機能破綻を引き起こす。免疫細胞などにおいて遺伝子改変によりオートファジーを欠如させると炎症性疾患などが発症することがマウスモデルで確認されているが、疾患病態におけるオートファジー活性については不明な点が多い。一方で、いくつかの神経変性疾患においてオートファジー不全によって異常タンパク質の蓄積が起こり、神経変性を引き起こすことが明らかになりつつある。アルツハイマー病においては、酵素によって切断されて細胞外へ放出されるアミロイドベータが凝集体を構成して神経毒性を引き起こすことが分かっている。これまでの自他の研究成果から、オートファジー活性化の均衡が崩れることにより発現量が変動する細胞外因子が存在し、疾患発症のトリガーとなっていると考えられている。このように、オートファジーに不全が起こり、疾患が引き起こされる段階的な過程において、細胞外レベルが顕著に変動するタンパク質は機能的な重要性だけでなく、関連疾患群の有効なバイオマーカーとなり得ることが期待され、網羅的解析が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では刺激性化合物で誘導したオルガネラ損傷に起因するオートファジーの活性化によって細胞外に放出されるプロテオームの分子動態を明らかにして、疾患発症のトリガーとなる機構を明らかにすることを目指した。オートファジーに関連する細胞外因子のプロテオミクス解析や同定因子の分子動態、疾患に関連する分子機構の解明を行い、オートファジーに関連する疾患発症の分子動態解明や創薬研究における分子ターゲットとして研究の更なる展開に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 細胞サンプルの調製・タンパク質調製

C57BL6 (WT型) マウス 15.5 日胚から胚性肝臓を調製し、M-SCF によってマクロファージに分化誘導した。これを TLR2 アゴニスト及びインターフェロン (IFN) によって前刺激させて細胞応答の反応性を上げ、刺激性化合物によって NLRP3 インフラマソームを誘導してオートファジーを活性化させる。この刺激処理の有無でそれぞれ細胞を調製し、細胞外タンパク質をそれぞれ精製する。刺激の有無で発現変動する因子群のうち、オートファジー活性にのみ相関しているものを絞るため、比較対象として Atg7-KO マウス由来マクロファージも調製した。刺激後の Atg7-KO と WT 型を比較することにより、オルガネラ損傷によるオートファジーの活性化で誘導されるタンパク質の発現変動を比較した。

(2) 定量性プロテオミクス解析

プロテオミクス解析においてはイオンスプレー法を用いた質量分析によってイオン検出強度による比較定量を行い、各サンプル間での発現量比を数値化した。

(3) 同定因子の分子動態および機能解析

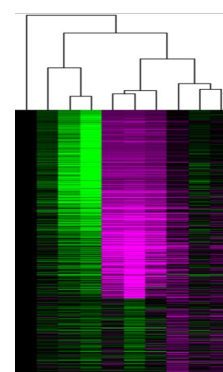
同定因子のうち、オートファジー欠損マウス由来細胞において、特に発現量に違いがあったタンパク質について、更なる解析を行った。まず、オートファジー不全および WT 型の生体マウスにおける血清中、尿中の発現量を疾病誘導措置の有無によって比較した。また、同定因子のノックダウン解析を行い、オートファジーや炎症応答における機能を検証した。さらに、当該因子が分泌されるまでの細胞内挙動を明らかにするため WT 型の骨髄由来マクロファージにおいて刺激の有無による細胞内局在の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 刺激によって細胞外に分泌・放出されるタンパク質の同定と比較定量

プロテオミクス解析により、オートファジー不全マウスおよび WT 型由来細胞の刺激前後の細胞外タンパク質の変動を比較定量することに成功し、3,000 以上のタンパク質を同定した。これらのクラスター解析を行い(図 1)、GO 解析などで変動した因子群のデータベース解析を行った。

図 1 Cluster assay

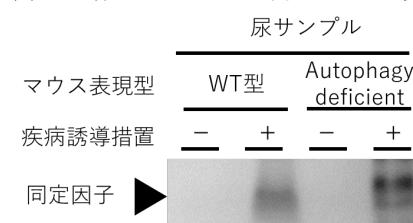


(2) 生体における発現の検証

同定タンパク質のうち、特に発現量の変動が大きかった因子について、生体マウス血清や尿サンプルを用いたウェスタンブロット解析

を行った。疾病誘導措置を行うことで当該因子の尿中、血中レベルが増加し、さらにこの増加量が骨髄系細胞をターゲットとした条件的オートファジー不全マウスにおいて顕著に増加することを示した(図 2)。

図 2 生体マウスにおける同定タンパク質の発現

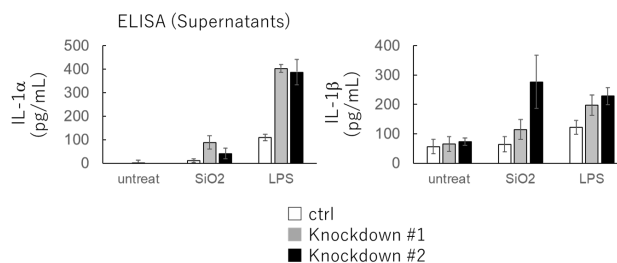


(3) ノックダウン解析

当該因子のノックダウン解析を行い、オートファ

ジーや炎症応答における分子機能を検証した。結果、p62/SQSTM1 の蓄積レベルに影響はなく、当該因子はオートファジー活性には影響しなかった。しかしノックダウンすると炎症性サイトカイン産生量が増加したことから、その産生誘導に関わっていることが ELISA 解析の結果示唆された(図 3)。

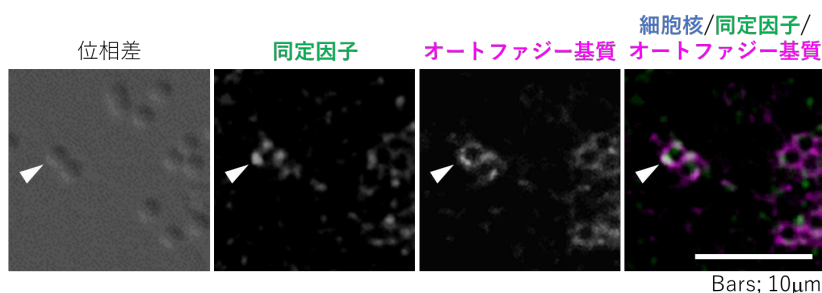
図3 ノックダウン解析



(4) 細胞内挙動の解析

当該因子が機能的に重要であり、生体レベルでも有効なバイオマーカー候補であることが示された。そこで当該因子が分泌される分子機構を明らかにするため、刺激前後の当該因子の細胞内局在を免疫染色によって解析した。結果、当該因子は刺激によって損傷したファゴソームに局在してくることが明らかになり、さらにオートファジー基質タンパク質と共局在することがわかった(図 4)。また、当該因子と基質タンパク質の相互作用を免疫沈降(IP)ウェスタンブロット解析においても示し、当該因子が損傷ファゴソームにおいて機能していることを示唆する結果を得た。

図4 オルガネラ損傷に起因する同定因子の細胞内挙動の変化



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 1 件)

著者名 印東厚、齊藤達哉
高尿酸血症と痛風,メディカルレビュー社 総数 1 ページ 2018 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。