

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590214

研究課題名(和文)白血球-血管内皮細胞間接着による双方向シグナル伝達の解析

研究課題名(英文) Analysis of bi-directional signal transduction elicited by adhesion between leukocyte and endothelial cells

研究代表者

藤田 寿一 (FUJITA HISAKAZU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30212187

研究成果の概要(和文)：1)白血球の細胞接着分子 JAML (Junctional adhesion molecule-like) と血管内皮細胞の接着分子 ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) が相互作用することを見出した。2) システイン・プロテアーゼあるカルパインの阻害剤はフォルミル・ペプチド受容体 (hFPR あるいは hFPR1) を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させて、細胞機能を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) We found the molecular interaction between JAML (Junctional adhesion molecule-like) and ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule). 2) Potent calpain inhibitors stimulate cell functions via activation of human formyl peptide receptor and human formyl peptide receptor-like 1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞間接着・カルパイン

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は体内に侵入した病原体を最初に認識して、応答する生体防御反応である。自然免疫の中心的役割を担っているのは白血球であり、なかでも好中球や単球は生体の防御機構としては最も早い段階で機能する細胞である。炎症は細菌の感染など生体組織が有害な刺激を受けたときに、その局所に惹起される一連の組織反応であり、侵襲に対する応答の表現の一つで生体が損

傷を受けた部分を隔離し、さらに修復・治癒をはかるための防衛機構である。白血球の血管外への移動は、炎症部位での病原体の食食・食胞内への顆粒放出・活性酸素生成といった感染防御において非常に重要である。一方、炎症反応は感染防御に必須であるが、過剰な反応はホストの生命の危機をもたらす敗血症などの病態を惹起する危険性をもっている。また近年では、動脈硬化への関与も考えられており、この反応は

厳密な制御を受ける必要がある。したがって、白血球の血管外への移動の分子基盤の全容を明らかにし理解することは、炎症が関与する病態の制御に大きく貢献すると考えられた。白血球の血管外移動は、大きくは1) ローリング、2) 強固な接着、3) 血管外遊走、そして4) 炎症組織への移動という4つの過程からなる。これまでに、前述の4つの過程の中で1) および2) に関与している細胞表面の接着分子 L-, E-, P-selectin やそのリガンドである糖鎖分子 s-Le<sup>x</sup>、また白血球のインテグリンである LFA-1, Mac-1, や VLA-4/5 とそれらのリガンドである血管内皮細胞表面上の ICAM-1/2 や VCAM-1 が関与する接着機構については研究が進んでいる。一方、3) あるいは4) に関与する接着分子や細胞内シグナル伝達機構に関しては、国内外においてあまり研究が進んでおらず、未知の部分が多く残されていた。白血球が単層の血管内皮細胞シートをすり抜けて血管外へ遊走するという過程は、非常にダイナミックな現象であり、細胞内の情報伝達経路では鍵となるタンパク質が局所的に、そして一過性に活性化されることで生じる多様なシグナル・ネットワークの形成が重要であると考えられる。したがって、全細胞抽出液の調製などにより対象となるサンプル全体を平均化して解析する事を基本としてきた従来の分子生物学的・生化学的手法に加えて、時間的・空間的な分子の挙動と情報伝達分子の活性化の検討が重要である。リアルタイムでの分子機能イメージングと形態イメージングを融合させた細胞生物学的手法を用いることで、生きた細胞でタンパク質の活性化状態を観察すれば、それらの空間的、経時的な活性化状態をリアルタイムに把握でき細胞内のダイナミックな情報の流れを捉えることで、血管外遊走というダイナミックな生物学的現象をより深く多面的に理解可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

白血球と血管内皮細胞が相互作用した結果、白血球では、その運動性を亢進するシグ

ナルが持続的に伝達され、血管内皮細胞側では、その細胞間接着が弱くなるシグナルが一過性に伝達されることで血管壁のインテグリティーが保たれ血管透過性が過剰に増加することなく血管外遊走が起こると考えられる。本研究では、白血球が単層の血管内皮細胞シートに潜り込んで血管外へ遊走する際に、白血球と血管内皮細胞との相互作用により生じる双方向へのシグナル伝達を分子レベルで明らかにすることで前述の仮説を証明することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯由来血管内皮細胞 HUVEC より調製した RNA を鋳型にして RT-PCR および PCR を行い、タイト・ジャンクションに局在する膜タンパク質 Junctional Adhesion Molecule (JAM) ファミリー (JAM1/2/3) および Occludin/Claudin5 の cDNA をクローニングした。

(2) 白血球が血管内皮細胞間をすり抜けて遊走する際、低分子量 G タンパク質が活性化するかどうかを生化学的手法で解析するためには、白血球と血管内皮細胞における、それぞれの低分子量 G タンパク質の活性化状態を区別する必要がある。そこで、Flag タグを導入した Rho ファミリーおよび Rap1 低分子量 G タンパク質の cDNA をレトロ・ウイルス、レンチ・ウイルス (白血球導入用)、あるいはアデノ・ウイルスベクター (血管内皮細胞導入用) に組み込んだ。次に構築した発現ベクターを白血球あるいは血管内皮細胞に導入して、白血球-血管内皮細胞の相互作用の際に血管内皮細胞で活性化している低分子量 G タンパク質を大腸菌で発現し、精製した GST 融合タンパク質 (Rho ; GST-Rhotekin RBD, Rac1&2/Cdc42 ; GST-PAK CRIB, Rap1 ; GST-RalGDS RA) を用いて Pull-down し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタン・ブロット法により検出した。

(3) 白血球の細胞接着分子 JAML (Junctional adhesion molecule-like) と血管内皮細胞側の接着分子 ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) や CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor) の cDNA をクローニングし、JAML および ESAM

ならびに CAR の細胞外ドメインをヒト免疫グロブリンの Fc 領域あるいは GST とのキメラ・タンパク質として発現するベクターを構築した。上記で構築した GST-JAML の発現ベクターをヒト胎児腎由来細胞 HEK293 にトランスフェクションし、細胞培養上清を回収して GST-JAML とのキメラ・タンパク質をグルタチオン・セファロースに結合し調製した GST-JAML ビーズを用いて JAML-Fc、ESAM-Fc、あるいは CAR-Fc の発現ベクターを HEK293 にトランスフェクションして得た細胞培養上清と混合し、Pull-down assay を行った。(4) システイン・プロテアーゼあるカルパインの阻害剤がヒト好中球や好中球様に分化した HL-60 で百日咳毒素感受性の細胞内カルシウム濃度  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすかどうかを細胞内カルシウムの指示薬である Fura2 を用いて検討した。さらにフォルミル・ペプチド受容体 (hFPR および hFPR1) を安定的に発現する HEK293 を樹立し種々な潜在的カルパイン阻害剤 (PD150606, PD151746, ALLN, ALLM, MG-132, および calpeptin), あるいは  $\gamma$ -secretase inhibitor I が、fMLP と同様に刺激に依存した  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすかどうか検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト臍帯由来血管内皮細胞 HUVEC より調製した RNA を鋳型にして RT-PCR および PCR を行い、タイト・ジャンクションに局在する膜タンパク質 Junctional Adhesion Molecule (JAM) ファミリー (JAM1/2/3) および Occludin/Claudin5 の cDNA をクローニングし、得られた cDNA の塩基配列の確認を行った。上記でクローニングした cDNA を緑色蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質として発現可能なベクターに組み込み、293T 細胞に遺伝子導入して、抗 GFP 抗体を用いて各々の全細胞タンパク質抽出液をウエスタン・ブロット法により解析した。その結果、GFP 融合 Junctional Adhesion Molecule (JAM) ファミリー (JAM1/2/3) および Occludin/Claudin5 は、cDNA から予想される分子量のポリペプチド鎖として発現していることが確認された。(2) 白血球が血管内皮細胞間をすり抜けて

遊走する際、低分子量 G タンパク質が活性化するかどうかを生化学的手法で解析するためには、白血球と血管内皮細胞における、それぞれの低分子量 G タンパク質の活性化状態を区別する必要がある。そこで、Flag タグを導入した Rho ファミリーおよび Rap1 低分子量 G タンパク質の cDNA をレトロ・ウイルス、レンチ・ウイルス (白血球導入用)、あるいはアデノ・ウイルスベクター (血管内皮細胞導入用) に組み込んだ。上記で構築した発現ベクターを白血球あるいは血管内皮細胞に導入して、全細胞タンパク質抽出液を抗 Flag 抗体によるウエスタン・ブロット法で各低分子量 G タンパク質の発現を確認したところ、血管内皮細胞への遺伝子導入は高効率で達成できたが、ヒト末梢血由来の好中球への遺伝子導入は困難であった。低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーおよび Rap1 のエフェクター分子での GTP 結合型認識ドメインを融合した GST タンパク質 (Rho; GST-Rhotekin RBD, Rac1&2/Cdc42 ; GST-PAK CRIB, Rap1 ; GST-RalGDS RA) を大腸菌で発現し、精製した。上記で構築したアデノ・ウイルス発現ベクターを血管内皮細胞に導入して、白血球-血管内皮細胞の相互作用の際に血管内皮細胞で活性化している低分子量 G タンパク質を、上記の精製した GST 融合タンパク質を用いて Pull-down し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタン・ブロット法により検出した。その結果、血管内皮細胞での低分子量 G タンパク質の活性化状態を検出することが可能であった。今後、さらに詳細な実験条件下で Rho ファミリーおよび Rap1 低分子量 G タンパク質の活性化を検討し、白血球と血管内皮細胞が相互作用する際の低分子量 G タンパク質の役割を明らかにしていく予定である。

(3) 白血球が血管内皮細胞間をすり抜けて遊走する際、白血球の細胞接着分子 JAML (Junctional adhesion molecule-like) と血管内皮細胞側の接着分子 ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) や CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor) が最初に相互作用すると考えられる。そこで、各々の接着分子が in vitro において相互作用するかどうかを検討した。白血球側の細胞接着分子 JAML および血管内皮細胞側の接着

分子 ESAM ならびに CAR の細胞外ドメインをヒト免疫グロブリンの Fc 領域あるいは GST とのキメラ・タンパク質を発現するベクターを構築した。上記で構築した GST-JAML の発現ベクターを HEK293 にトランスフェクションし、細胞培養上清を回収して GST-JAML とのキメラ・タンパク質をグルタチオン・セファロースに結合した。上記 2) で調製した GST-JAML ビーズを用いて JAML-Fc、ESAM-Fc、あるいは CAR-Fc の発現ベクターをヒト胎児腎由来細胞 HEK293 にトランスフェクションして得た細胞培養上清と混合し、Pull-down assay を行った。その結果、JAML は ESAM あるいは CAR と相互作用することが明らかとなった。一方、JAML どちらのホモフィリックな相互作用は認められなかった。(図 1) 今後、今回見出した JAML と ESAM あるいは CAR との相互作用が細胞レベルでも実際に起こり白血球と血管内皮細胞が互いに接着した際に、双方向にシグナルを伝達しているかどうかを Rho ファミリーおよび Rap1 低分子量 G

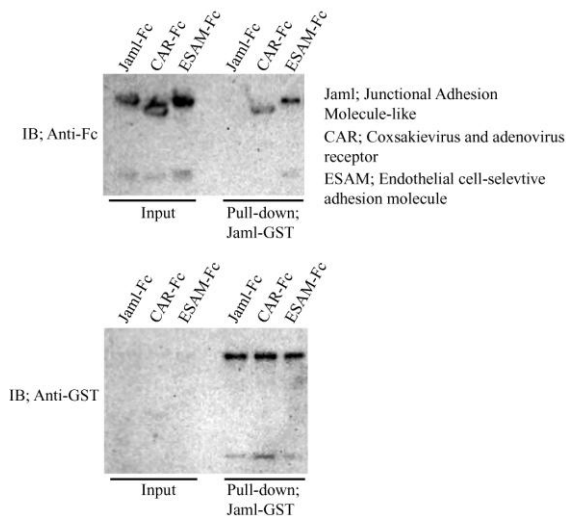


図1 Jaml, CARおよびESAMの相互作用

タンパク質の活性化や MAP-Kinase ファミリーの活性化を検討することで、白血球と血管内皮細胞が相互作用した際における両細胞内のシグナル伝達機構を明らかにしていく予定である。

(4) システイン・プロテアーゼあるカルパインの阻害剤はヒトの好中球や単球において百日咳毒素感受性のケモタキシスを誘導

する。種々のカルパイン阻害剤 (PD150606, PD151746, ALLN, ALLMおよびcalpeptin) がヒト好中球や好中球様に分化したHL-60で百日咳毒素感受性の細胞内カルシウム濃度  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすことを見いだした。(図 2)

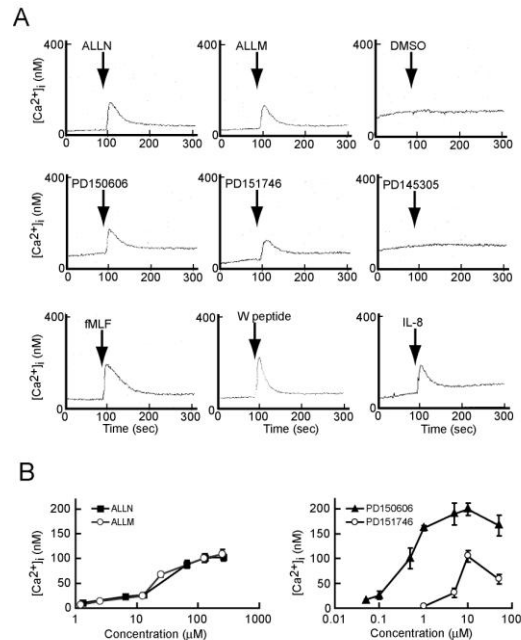


図 2 カルパイン阻害剤による細胞内カルシウム濃度の上昇 また、フォルミル・ペプチド受容体 (hFPR およびhFPRL1) を安定的に発現するHEK-293 で種々な潜在的カルパイン阻害剤 (PD150606, PD151746, ALLN, ALLM, MG-132, およびcalpeptin), あるいは  $\gamma$ -secretase inhibitor Iが、fMLFと同様に刺激に依存した  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすことを見いだした。(図 3)

親株である HEK293 では calpeptin および  $\gamma$ -secretase inhibitor Iにより、百日咳毒素感受性の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が認められ、一方、MG-132では百日咳毒素非感受性の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が認められた。検討したカルパイン阻害剤のなかで、唯一、MDL-28170 はヒト好中球やフォルミル・ペプチド受容体 (hFPRおよびhFPRL1) 安定的に発現する HEK293において  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こさなかった。(図 4)

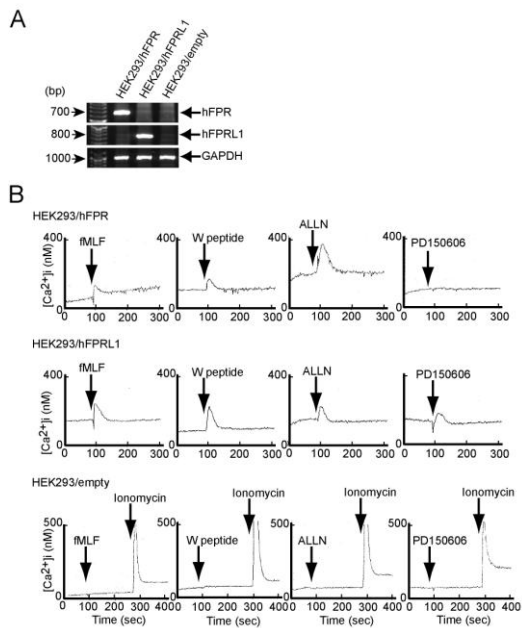


図3 フォルミル・ペプチド受容体 (hFPRまたはhFPRL1) を発現するHEK293細胞におけるカルパイン阻害剤の細胞内カルシウム濃度への影響

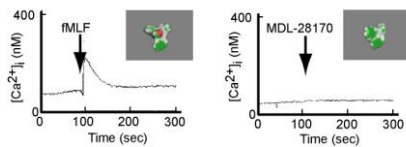


図4 カルパイン阻害剤 (MDL-28170) の細胞内カルシウム濃度への効果

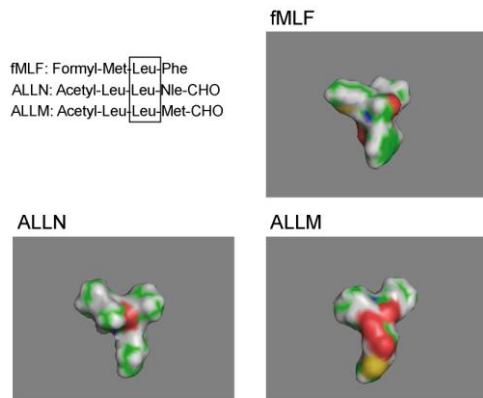


図5 fMLFおよびカルパイン阻害剤 (ALLN/ALLM) の立体構造

ALLNおよびALLMの立体構造はfMLFに類似しており、(図5)分子結合シミュレーションから、ALLNあるいはPD150606はhFPRあるいはhFPRL1の推定上のfMLF結合部位と相互作用することが明らかになった。

以上より、カルパイン阻害剤はフォルミル・ペプチド受容体 (hFPRあるいはhFPRL1) を介して細胞機能を刺激することが示唆された。

## 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6件)

- ① H. Fujita, T. Kato, S Fukuzono, N. Watanabe, T. Takahashi and S. Kitagawa: Potent calpain inhibitors stimulate cell functions via activation of human formyl peptide receptor and human formyl peptide receptor-like 1. **Arch. Biochem. Biophys.** 査読有、in press
- ② S. Fukuzono, T. Kato, H. Fujita, N. Watanabe, and S. Kitagawa: Granulocyte colony-stimulating factor negatively regulates Toll-like receptor agonist-induced cytokine production in human neutrophils. **Arch. Biochem. Biophys.** 査読有、495,1 44-151 (2010)
- ③ H. Noma, T. Kato, H. Fujita, M. Kitagawa, T. Yamano, and S. Kitagawa: Calpain inhibition induces activation of the distinct signalling pathways and cell migration in human monocytes. **Immunology** 査読有、128, e487-e496 (2009)
- ④ Y. Ozaki, T. Kato, M. Kitagawa, H. Fujita, and S. Kitagawa: Calpain inhibition delays neutrophil apoptosis via cyclic AMP-independent activation of protein kinase A and protein kinase A-mediated stabilization of Mcl-1 and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). **Arch Biochem Biophys.** 査読有、477, 227-231 (2008)
- ⑤ M. Katsube, T. Kato, M. Kitagawa, H. Noma, H. Fujita, and S. Kitagawa: Calpain-mediated regulation of the distinct signaling pathways and cell migration in human neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** 査読有、84, 255-263 (2008)
- ⑥ E. Shima, M. Katsube, T. Kato, M. Kitagawa, F. Hato, M. Hino, T. Takahashi, H. Fujita, and S. Kitagawa: Calcium Channel Blocker Suppress

Cytokine-Induced Activation of Human Neutrophil. **Am. J. Hypertension** 査読有、21, 78-84 (2008)

[学会発表] (計2件)

- ① 藤田 寿一、Calpain inhibitors stimulate cell functions via activation of human formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 1、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日、神戸
- ② 福菌 駿介、G-CSFはTLRアゴニスト刺激によって誘導されるヒト好中球からのサイトカインの産生を負に制御する、日本生理学会近畿生理談話会、2009年12月13日、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 寿一 (FUJITA HISAKAZU)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：30212187

### (2) 研究分担者

加藤 隆幸 (KATO TAKAYUKI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：50343413  
北川 誠一 (KITAGAWA SEIICHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50133278

### (3) 連携研究者

なし