

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790159

研究課題名（和文） 小胞輸送関連分子欠失マウスを用いたマクロファージによる異物貪食機構の検討

研究課題名（英文） Analysis for Phagocytosis in mice lacking vesicular associated membrane protein-7 (VAMP7)

研究代表者

佐藤 真人 (MAHITO SATO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60375532

研究成果の概要（和文）：

マクロファージによる異物貪食は外来微生物からの免疫応答に重要な役割を果たしている。本研究ではマクロファージの異物貪食の分子機構について、小胞輸送に関連する分子であるVAMP7を欠失したマウス(VAMP7 KO マウス)を用いて検討した。その結果、VAMP7 依存的な異物貪食は経路特異的であること、ファゴソームとライソソームの融合に関係する可能性があることを明らかにした。また個体におけるマラリア感染に対する免疫応答にはVAMP7は関与していないと推測された。

研究成果の概要（英文）：

Phagocytosis by macrophages plays important roles in immune response to microbes. In this study, we investigated the molecular mechanisms of phagocytosis by using mice lacking the VAMP7 gene, which regulate vesicular trafficking. The results show the possible roles of VAMP7 in phagocytosis and phagosome-lysosome fusion in macrophages through some specific pathways. However, we also revealed that VAMP7 does not regulate immune response to malaria. The physiological roles of VAMP7 are still to be investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：マクロファージ 異物貪食 遺伝子欠失マウス

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージなどの貪食細胞が異物を貪食し消化するには種々の細胞内小器官が関わっている。とりわけ Lysosome の重要性が報告されているが、その分子メカニズムについてはいまだに不明な点が多い。また、こ

のような Phagocytosis における細胞内小器官の動態については、主に培養細胞株を用いた実験によって解析されてきているが、それに関与する分子の高等動物の組織や細胞における生理的な意義はほとんど明らかになっていない。

VAMP7/TI-VAMP (Vesicular-Associated Membrane Protein-7)はLysosomeに局在するSNARE 蛋白の一つで、Lysosomal exocytosis や Lysosome 同士の融合に重要と考えられている。Phagocytosisとの関連では、VAMP7 をノックダウンしたマクロファージ系の培養細胞でヒツジ赤血球の食食効率が著しく低下することが報告されている (Braun et al. EMBO J. 23 p4166, 2004)。これら以外でも培養神経細胞の突起伸長や上皮細胞における形態形成に重要な極性輸送の際も VAMP7 の関与が示唆されている。

そこで VAMP7 が高等真核生物の細胞内小胞輸送においていかに重要であるかを個体レベルで明らかにするために、VAMP7 のノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。予想に反して上皮組織や神経組織には大きな異常を認めなかったが、腹腔マクロファージを用いた食食実験で、ヒツジ赤血球の食食能が低下している可能性が示唆された。また食食された赤血球周囲への Lysosome マーカーの集積が VAMP7 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは低下している可能性を示す所見も観察した。

これらのことより VAMP7 がマクロファージの食食能に関与している可能性が考えられたことから本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

これまでの研究からマクロファージの異物食食能、およびその後の Phagosome の成熟に関係する v-SNARE として VAMP7 が挙げられている。本研究ではその過程における VAMP7 の役割を VAMP7 ノックアウトマウス由来の培養マクロファージを用いて検討した。またノックアウトマウスを用いる最大の利点として、個体レベルでの解析が可能のため、マウス・マラリアモデルを用いてその生理的意義についても検討した。

これらを通して外来微生物に対する初期の免疫応答としてきわめて重要な役割を果たしているマクロファージによる異物食食に細胞内膜輸送がどのように関与しているか、明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 異物食食の効率について

野生型および VAMP7 ノックアウトマウス (主に 6-8 週齢を使用) の腹腔にチオグリコネートを注入することで炎症を惹起し、腹腔マクロファージを取得した。取得したマクロファージにヒツジ赤血球や Zymosan、大腸菌パーティクルといった異物を付加し食食効率を測定した。これにより VAMP7 が、特定の経路に特異的に関わるのか、それとも全ての食食経路に関わるのか検討した。

### (2) Phagosome の成熟について

VAMP7 ノックアウトマウス由来腹腔マクロファージ中の種々のオルガネラの動態を、Lysosome を中心に、更に分子細胞生物学的に解析した。特に VAMP7 は Lysosomal exocytosis に関与することが知られているため、異物食食時のマクロファージにおける Lysosomal marker 分子の動態を共焦点レーザー顕微鏡や免疫電子顕微鏡を用いて解析を行った。

### (3) 生理的意義について

VAMP7 欠失による食食能の変化がもたらす生理的意義について、マウス・マラリアモデルを用いて解析した。具体的にはマウスのマラリアである *P. yoelii* を野生型および VAMP7 ノックアウトマウスに感染させ、生存率、感染率を比較した。また主に感染後の脾臓で、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡を用いて形態学的な解析を行った。その際、遺伝的なバックグラウンドを統一するため、8代にわたり野生型 C57BL6 マウスと交配させて作成した VAMP7 ノックアウトマウスを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) マクロファージによる異物食食における VAMP7 の関与

VAMP7 ノックアウトマウス由来マクロファージにおける異物食食効率についての研究結果を図 1-3 に示す。

図 1 はオプソニン化していないヒツジ赤血球を食食させた際の取り込み効率を測定したものである。VAMP7 ノックアウトマウス由来腹腔マクロファージでは野生型マウスと比較して、非オプソニン化ヒツジ赤血球の食食効率がわずかに低下していた。しかし統計学的有意差はなく、非オプソニン化赤血球は VAMP7 非依存的な経路により食食されると推測された。

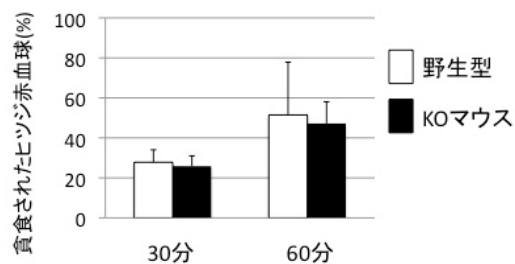


図1: 非オプソニン化ヒツジ赤血球の取り込み

図 2 は大腸菌 BioParticle の取り込み効率を測定したものである。図に示す通り、野生型マウスと VAMP7 ノックアウトマウスとは全く差が見られなかった。

図 3 は補体依存的に食食されることが知られている Zymosan 粒子を取り込んだマクロフ

アージである。図に示す通り、ノックアウトマウスにおいても野生型同様に Zymosan 粒子の取り込みが観察された。

これまでの報告から、VAMP7 はオプソニン化ヒツジ赤血球の貪食における VAMP7 の関与することが知られている。今回の研究成果を合わせると、マクロファージの異物貪食における VAMP7 の関与は経路特異的であることが示唆された。

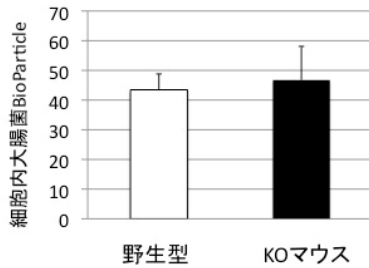


図2: 大腸菌BioParticleの取り込み

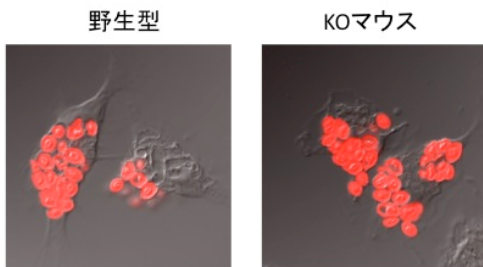


図3: 蛍光標識したZymosanを貪食したマクロファージ

### (2) Phagosome-Lysosome fusion (P-L fusion)における VAMP7 の関与

VAMP7 は Lysosome 膜上に局在し、Lysosome と形質膜との融合を調節していることが知られている。異物貪食後の Phagosome の酸性化に Lysosome が関係しており (P-L fusion), その過程における VAMP7 の関与について免疫電子顕微鏡で検討した。

得られた結果を図4に示す。VAMP7 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、Phagosome 上に局在する Lysosome マーカー分子 LAMP-1 のシグナル数が少ない傾向が観察された。このことは貪食された異物を処理するために必要な phagosome の成熟に VAMP7 を介した P-L fusion が関与している可能性を示している。

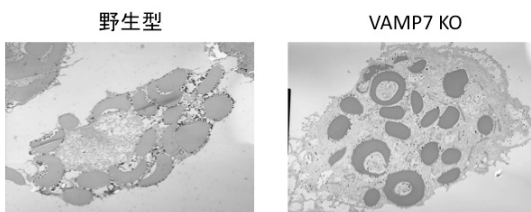


図4 ヒツジ赤血球貪食後のマクロファージ: 免疫電子顕微鏡写真

しかしながら、同時に個体間および細胞間におけるデータの差も大きく、P-L fusion における VAMP7 の関与を結論づけるには骨髄由来マクロファージを用いた検討が必要と思われる。

### (3) 生理的意義について

本研究における最大の特徴はノックアウトマウスを用いることで、VAMP7 欠失の影響を個体レベルで検討できる点が挙げられる。そこで VAMP7 欠失によるマクロファージ貪食能の変化がもたらす生理的意義について、マウス・マラリアモデルを用いて検討した。

マウス・マラリア Plasmodium yoelii 感染後の生存率を図5に示す。VAMP7 ノックアウトマウスでは半数が5日までに死亡したのに対し、野生型では半数が死亡するまでに6日を要した。わずかながら VAMP7 ノックアウトマウスでマラリアの重症化が早まることが示唆された。

感染後日数	day4	day5	day6	day7	day8
野生型	6	6	5	1	0
KOマウス	6	6	3	0	0

図5. P.yoelii感染後の生存マウス数

一方で、マラリア感染マウス中の赤血球における感染率を測定した結果を図6に示す。P. Yoelii が検出された赤血球の割合は、観察中のどの日時においても野生型マウスと VAMP7 ノックアウトマウスの間に有意な差が認められなかった。

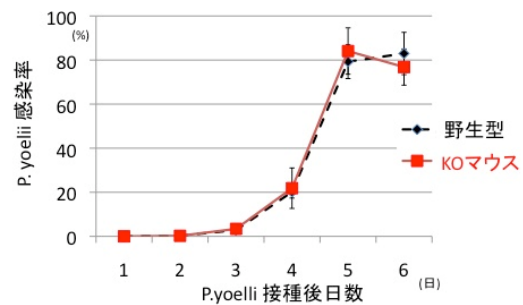


図6: P. yoelii感染率の変化

マラリア感染マウスより取得した脾臓の電子顕微鏡の所見を図7に示す。野生型マウス、VAMP7 ノックアウトマウスいずれにおいても脾臓内にマラリア感染赤血球を貪食したマクロファージが観察された。

これらのことからマラリア感染時における免疫応答については VAMP7 の関与は否定的と考えられた。

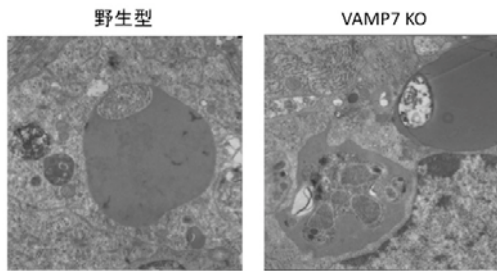


図7 マラリア感染マウスの脾臓  
:電子顕微鏡写真

## 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2件)

(1) Nakahara T, Sato H, Shimizu T, Tanaka T, Matsui H, Kawai-Kowase K, Sato M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M. Fibroblast growth factor-2 induces osteogenic differentiation through a Runx2 activation in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2010, 394(2):243-248

(2) Tajika Y, Murakami T, Sato M, Kubota F, Yorifuji H. VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development. *Dev Dyn.* (査読あり) 2008 ;237(7):1886-1892

〔学会発表〕(計6件)

(1) 多鹿友喜、高橋麻衣子、佐藤真人、村上徹、依藤宏. 筋衛星細胞の活性化過程における VAMP2 の発現変化. 第 115 回日本解剖学会・学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 盛岡

(2) 高橋麻衣子、多鹿友喜、佐藤真人、村上徹、依藤宏. 筋ジストロフィーマウス骨格筋における VAMP5 の発現. 第 115 回日本解剖学会・学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 盛岡

(3) 佐藤真人, 佐藤隆史, 植村武文, 國井政孝, 多鹿友喜, 村上徹, 依藤宏, 原田彰宏. 細胞極性関連因子 VAMP7 欠失マウスの解析. 第 114 回日本解剖学会・学術集会. 2009 年 3 月 29 日. 岡山

(4) 多鹿友喜、佐藤真人、村上徹、依藤宏. 筋管細胞における VAMP2 の細胞内局在. 第 114 回日本解剖学会・学術集会. 2009 年 3 月 28 日. 岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 真人 (MAHITO SATO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60375532