

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09267

研究課題名(和文) 漏出細胞内タンパク質の細胞外機能：組織損傷時の貪食細胞への作用と炎症・抗炎症調節

研究課題名(英文) Extracellular functions of leaked intracellular proteins: effects on phagocytic cells and pro-/anti-inflammatory regulation in tissue injury.

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) 3,400,000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、単球や内皮への作用を示す細胞外機能分子を同定した。本機能分子の役割を明らかにするために、貪食細胞への影響を解析した。マクロファージ様に分化させたTHP-1細胞を用いた実験で、本機能分子は貪食を促進させ、IL-10の産生も増強した。これは、本機能分子がマクロファージに直接作用し、貪食を促進する一方で、抗炎症性サイトカインにより炎症を終息に導くことを示唆している。急性期病態の観点からは、本機能分子は、サイトカインストームなど、過剰な炎症反応を防ぐ善玉の役割を担っていると結論づけた。

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、マクロファージによる損傷組織の除去に直接作用するだけでなく、さらに過剰な炎症拡大を抑えるために抗炎症性サイトカインの産生も促進していることを示しており、サイトカインストーム等の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、組織損傷と修復過程の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 and endothelium. To clarify the role of this functional molecule, we analyzed the effect on phagocytic cells. In experiments using macrophage-like differentiated THP-1 cells, the functional molecule promoted phagocytosis and enhanced IL-10 production. This suggests that the functional molecule acts directly on macrophages and promotes phagocytosis, while the anti-inflammatory cytokine leads to termination of inflammation. From the pathological view point, we concluded that the functional molecule plays a beneficial role in preventing excessive inflammatory reactions such as cytokine storm.

研究分野：医歯薬学

キーワード：組織損傷 タンパク質漏出 貪食細胞 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内局在タンパク質の細胞外への漏出とバイオマーカー

組織損傷にともなって漏出する細胞内局在タンパク質は、様々な疾患のバイオマーカーとして利用されている。例えば、DNA 結合タンパク質である high mobility group box-1 (HMGB1)は、広汎な組織分布を示すが、体液中では敗血症などの重症度と相関し、さらに急性期病態を悪化させる炎症メディエーターとしても機能する。

(2) 疾患プロテオーム解析が意味すること

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。このように病態と相関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。

(3) 細胞表面結合能に基づく潜在的細胞外機能分子の網羅的同定

これまでに患者体液中から同定した細胞内タンパク質の本来の活性や元の局在は多岐にわたり、バイオマーカーの網羅的な機能解析は困難であった。そこで、「細胞機能に影響を与える漏出タンパク質は細胞表面に結合する」と仮定し、申請者らが開発した細胞表面標識と大規模タンパク質解析システムを組み合わせたプロテオーム解析技術により網羅的探索を行った。損傷線維芽細胞からの漏出タンパク質 (580 種類) と単球系細胞株 U937 細胞表面への結合タンパク質 (454 種類) を個別に同定し、最終的に「損傷細胞から漏出し、単球表面に結合する 168 種類の潜在的な細胞外機能分子」を特定した。これらの中には HMGB1、ヒストンなどの既知炎症メディエーターや組織損傷マーカーに加え、患者体液で見出される細胞内ハウスキーピングタンパク質も多数含まれていた。

(4) 細胞外へ漏出した細胞内タンパク質の単球・内皮への作用

同定された潜在的細胞外機能分子のうち、「疾患関連マーカー」として知られているものについて U937 細胞への作用を調べて行く過程で、代謝酵素のひとつが新規のシグナル分子活性により細胞内シグナルカスケードのリン酸化を増強することが明らかとなった。さらに相互作用タンパク質を探索した結果、細胞表面マーカーのひとつがこの細胞外機能分子の受容体として同定され、同受容体を発現する内皮細胞では、創傷治癒モデルでの運動性を顕著に増加させた。

(5) 細胞外機能分子の主要ターゲットは組織中の貪食細胞か？

明らかになった細胞外機能分子の作用として、単球表面への結合と細胞内シグナル分子活性、および内皮細胞での運動性増加が挙げられるが、単球-内皮結合への直接的な影響は見られていない。一方、対応する受容体の発現は、単球や内皮のみならず、マクロファージ、好中球、マイクログリアなどでも報告されていた。これまで、急性期の血管内イベントに注目し、解析を進めてきたが、解析結果を俯瞰すると「より運動性の高いマクロファージなど、組織中の貪食細胞が本細胞外機能分子の主要なターゲットなのでは？」との考えに至った。貪食による死細胞除去とそれに続く炎症応答調節に与えるインパクトを解析することで、漏出タンパク質の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) 本研究の目的は、新たに見出した漏出細胞内タンパク質の細胞外機能について、組織中の貪食細胞、主としてマクロファージによる死細胞除去とその後の炎症応答 (収束 or 拡大) という観点から、ターゲットとなる反応とその作用を解析し、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や創薬ターゲットとしての有用性を明らかにすることである。本研究では、分化誘導後のヒト単球系細胞株 THP-1 を使用し、遊走、貪食、さらに炎症性・抗炎症性応答の調節に対する細胞外機能分子の作用について解析し、その分子機序を明らかにする。急性期病態での役割が善玉であるか悪玉であるかを判定し、新たな治療法への応用につなげる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト単球系細胞株 (THP-1) は、5%牛胎児血清を含む RPMI 培地にて、常法に則って培養した。マクロファージ様 THP-1 (M-THP-1) は、THP-1 をホルボールエステル存在下 (100 ng/mL PMA) で 24 時間以上培養し、調製した。

(2) 運動性解析

スクラッチアッセイは、以下の条件で行った。24-well プレートで培養した M-THP-1 の一部をプラスチックチップにて剥離（長さ 1 cm x 幅 1 mm）させ、培地とともに除去・洗浄を行った後、組換え細胞外機能分子（0.1 mg/ml）あるいはコントロールとして vehicle を添加した新鮮培地を加え、剥離面への移動を経時的に観察した。

(3) 遊走能解析

M-THP-1 の遊走能は、CytoSelect 24-well Cell Migration Assay（セルバイオラボ社）を使用して測定した。培地は、上槽、下槽ともに、0.1 mg/mL BSA を含む無血清培地を使用した。遊走チャンバー上槽に M-THP-1 を、下槽に走化性因子 MCP-1（100 ng/mL）を添加し、90 分間の培養後、膜を通過し下槽へ移動した M-THP-1 の細胞数を蛍光法により計測した。細胞外機能分子の遊走能に対する影響解析では、上槽に細胞外機能分子（0.1 mg/mL）を添加した。また、自身が遊走因子である可能性については、MCP-1 の代わりに下槽に添加し、同様の解析を行った。

(4) ビーズに対する貪食能解析

M-THP-1 の貪食能は、Phagocytosis Assay Kit, IgG FITC（ケイマンケミカル社）を使用して測定した。24-well プレートで培養した M-THP-1 に蛍光標識ウサギ IgG 被覆したラテックスビーズを添加し、2 時間培養後、細胞内に取り込まれた蛍光標識をプレートリーダーにて測定した。Hoechst33342 による核染色を同時に行い、細胞数で補正した数値を貪食能とした。

(5) マウス細胞障害性 T 細胞からの死細胞調製と M-THP-1 による貪食

細胞貪食能を解析するために、培養細胞のアポトーシス処理、およびネクローシス処理を行い、死細胞を調製した。マウス細胞障害性 T 細胞株（CTLL-2）は、10%牛胎児血清を含む RPMI 培地にマウス IL-2（100 U/mL、リコンビナント）を添加し、常法に則って培養した。CTLL-2 のアポトーシス処理は、IL-2 不含培地で 24 時間培養することにより行った（Apo-CTLL-2）。CTLL-2 のネクローシス処理は、PBS 中に懸濁した CTLL-2 を凍結/融解（合計 3 セット）することにより行った（Nec-CTLL-2）。M-THP-1 による死細胞の貪食は、24-well プレートで培養した M-THP-1 に、Apo-CTLL-2、あるいは Nec-CTLL-2 を添加し、培養することで行い、24 時間後の培地を回収し、細胞成分を遠心除去後、各種 ELISA に使用した。

(6) ELISA 法による炎症関連サイトカインの測定

M-THP-1 による死細胞貪食時のサイトカイン産生は、以下の ELISA キットにより解析した。Human IL-1 beta Quantikine ELISA Kit（R&D 社）、Human G-CSF Quantikine ELISA Kit（R&D 社）、Human LAP (TGF-beta 1) Quantikine ELISA Kit（R&D 社）および Human IL-10 ELISA Kit（ダイアクロン社）。

4. 研究成果

(1) THP-1 から M-THP-1 への分化誘導に対する細胞外機能分子の影響

はじめに、PMA による単球からマクロファージへの分化誘導に関して、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、THP-1 の増殖に影響を与えなかった。また、マクロファージ様細胞を含む M-THP-1 の細胞数や細胞形態にも、無添加時との違いは見られず、検討した細胞外機能分子の濃度範囲では、貪食細胞への誘導に影響を与えなかった。

(2) M-THP-1 の運動性に対する細胞外機能分子の影響

スクラッチアッセイにおいて、一定の剥離面へ移動した M-THP-1 は、細胞外機能分子添加条件で、24 時間後に 16 +/- 4 個、3 日後に 38.5 +/- 2.5 個、コントロール条件では、各々 19 +/- 0 個と 44.5 +/- 4.5 個であり、有意な差は見られなかった。すなわち、細胞外機能分子は M-THP-1 の運動性に影響を与えないと考えられた。

(3) M-THP-1 の遊走能に対する細胞外機能分子の影響

トランスマイグレーションアッセイで、上槽から下槽へ移動した M-THP-1 の細胞数は、細胞外機能分子の上槽への添加時と非添加時で有意な差は見られなかった。また、細胞外機能分子を下槽に添加した実験では、MCP-1 のような走化性は見られなかった。

(4) M-THP-1 の貪食能に対する細胞外機能分子の影響

蛍光標識ウサギ IgG 被覆ラテックスビーズを貪食した M-THP-1 は、細胞外機能分子存在下では、非存在下に比べて約 2 倍の蛍光強度を示し、本機能分子が M-THP-1 の貪食能を増強することが明らかとなった。

(5) M-THP-1 による死細胞貪食時のサイトカイン産生に対する細胞外機能分子の影響

貪食細胞における機能的役割を明らかにするために、アポトーシス、およびネクローシスによる細胞死を誘導したマウス CTLL-2 細胞を M-THP-1 に貪食させ、培地中の各種サイトカイン

ンの濃度を測定した。Apo-CTLL-2、および Nec-CTLL-2 を貪食した M-THP-1 によるサイトカイン産生は、細胞外機能分子添加により IL-10 が有意に増加した (1.9~2.7 倍、 $p<0.05$)。一方、IL-1 beta や TGF-beta については、細胞外機能分子による有意な影響が見られなかった。また、G-CSF については、いずれの試料も検出限界以下であった。

(6) マクロファージによる貪食、サイトカイン産生、想定されるシグナル経路について

以上の結果から、貪食細胞に対する細胞外機能分子の主要な役割は、貪食能の亢進とそれに続く抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生増強であると結論付けた。本細胞外機能分子の相互作用タンパク質として、これまでに同定した細胞表面受容体は、貪食での役割が想定されている。具体的なシグナル伝達については、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。一方、本細胞外機能分子に対する細胞表面受容体を通じたサイトカイン産生制御についてはこれまでに報告はない。本研究で明らかになった IL-10 は、抗炎症性サイトカインであり、その産生増強は、体内での炎症を局所に限局し、過剰な炎症反応が全身に波及することを防止するという観点から、重要な知見と言える。貪食する死細胞がアポトーシスかネクローシスかにより、炎症に関わるサイトカイン産生のパターンが変化するが、本研究では、IL-10 の産生量に大きな差が見られなかった。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、サイトカイン産生を増強させるかについては、さらなる解析が必要である。

(7) まとめ

本研究により、組織損傷に伴い細胞内から漏出する本機能分子の役割は、i) マクロファージに直接作用して貪食を促進するとともに、ii) IL-10 産生を増強し、損傷部位周囲の炎症反応を早期に終息させることであると考えられた。急性期病態の観点からは、本機能分子は、サイトカINSTORM など、過剰な炎症反応を防ぐ善玉の役割を担っていると結論づけた。この細胞外機能分子は、マクロファージに加えて、単球や内皮に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0件

〔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, 高見太郎
2. 発表標題 血管内イベントにおける漏出細胞内タンパク質の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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)	東京都立大学・理学研究科・准教授 (22604)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------