

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月19日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659043

研究課題名（和文） アポトーシス細胞の貪食における受容体キナーゼの役割解明

研究課題名（英文） Role of GRK in engulfment of apoptotic cells

研究代表者

黒瀬 等 (Hitoshi Kurose)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10183039

研究成果の概要（和文）：

生体内ではアポトーシスを起こした細胞は、マクロファージなどの貪食細胞によって速やかに除去されている。この過程が損なわれると、アポトーシス細胞は後期ネクロシスに移行し、自己の成分を漏出させる。これが自己抗体の出現や炎症などを引き起こし、生体内の恒常性の破綻につながる。これまでの報告から、アポトーシス細胞の消去を行う貪食経路として3種（Abl/ Abi、ELMO/ DOCK180 および ABC/ MFGF10/ GULF/ dynamin シグナル経路）が明らかにされている。本研究では、G タンパク質共役型受容体（GPCR）の活性調節を行うとのみ考えられてきたリン酸化酵素6（GPCR キナーゼ：GRK6）が、これまでとは異なった経路で貪食を仲介していることを明らかにした。GRK6 は、GIT と Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) と結合することで、最終的に Rac1 を活性化し貪食を促進させていた。GRK6 を介した貪食は内在性のマクロファージでも観察され、GRK6 をノックアウトさせたマウス（GRK6-KO マウス）は自己免疫疾患の一つ全身性エリテマトーデス様の症状（抗二本鎖 DNA 抗体の発現と免疫複合体の腎臓への蓄積）を示した。また、GRK6-KO マウスの脾臓を調べたところ、アポトーシスを起こした B 細胞を貪食する白脾髄では、マクロファージによって貪食されずに残っているアポトーシス細胞の数が野生型に比べて多く観察された。一方、老廃赤血球を処理する赤脾髄では、赤血球が処理されないために鉄の蓄積が増加していた。これらの結果は、GRK6 がアポトーシス細胞の貪食を仲介する新たな分子であり、機能の低下は自己免疫疾患の発症や赤血球のリサイクルに影響を与えることを示している。本研究は、これまで GPCR の活性調節を行うのみと考えられていた GRK の生体内での新たな役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the body, apoptotic cells are rapidly removed by the cells such as macrophages and dendritic cells. Otherwise, inefficient removal of apoptotic cells results in transition of apoptotic cells to late necrotic cells and leakage of their own intracellular contents. This leakage causes appearance of autoantibody and induction of inflammation, leading to collapse of the body's homeostasis. The removal of apoptotic cells is called as engulfment. So far, there are three engulfment pathways: Abl/Abi, ELMO/DOCK180, and ABC/MFGF10/GULF/dynamin signaling pathways. In this study, we revealed that G protein-coupled receptor (GPCR) kinase 6 (GRK6), which is believed to regulate GPCR function, was involved in engulfment. This pathway was independent of three known pathways. GRK6 bound Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) and ultimately activated Rac1 that is indispensable for engulfment. GRK6-mediated engulfment was also observed in endogenous macrophages. In GRK6 knockout (GRK6-KO) mice, systemic lupus erythematosus (SLE), one of autoimmune diseases, -like symptoms such as increased anti-double strand DNA antibody in the plasma and deposition of immunocomplex in the kidney were observed. Furthermore, we observed abnormalities in the spleen. In white pulp of the spleen that removes apoptotic B cells, the number of unengulfed apoptotic cells in GRK6-KO mice was higher than that in wild type mice. In red pulp of the spleen that removes aged red blood cells, we observed the increased iron deposition due to impaired

removal of aged red blood cells. These results suggest that GRK6 is a mediator of engulf apoptotic cells, and impaired function of GRK6 results in autoimmune disease and affects recycling of red blood cells. This study reveals that GRK has a new role in the cells and body, although GRK is generally accepted as a mediator of GPCR regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体キナーゼ、細胞内シグナル伝達、アポトーシス、自己免疫疾患、食食、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

生体内では、発生段階や細菌・ウイルス感染時などの様々な局面で不要になった細胞あるいは有害となった細胞が生み出されている。そのような細胞は、アポトーシスを起こし、マクロファージなどの食食細胞によって速やかに食食され処理されている。この速やかな食食は死細胞からの内容物の流出を防ぐなど、生体内の恒常性を保つために必須の過程である。これまで、食食過程には3つの経路（Abl/ Abi シグナル経路、ELMO/ DOCK180/ Rac シグナル経路および ABC/ MFGF10/ GULP/ Dynamin シグナル経路）が存在すると報告されている。しかしながら、これまでの報告では、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）およびその下流のシグナルに焦点をあてたものはない。

申請者は、心疾患のメカニズム解析を、GPCRを介したシグナリングを中心に解析してきた（EMBO J 2008;27:3104-15などで報告）。心疾患の一つに心筋梗塞がある。心筋梗塞に陥った個所は酸素の供給が停止するため、死亡する。この際生じる死細胞は迅速に除去される必要がある。この過程に細胞の食食が関与しているのではという仮定の下、GPCRシグナリングおよびその調節分子の食食への関与

を検討した。GPCRはアゴニストの結合した受容体をリン酸化する受容体キナーゼ（G protein-coupled Receptor Kinase: GRK）およびリン酸化された受容体に結合しGPCRとGタンパク質とのカップリングを抑制するβアレスチンによって制御されている。そこで、これら分子が食食に関与しているのかを検討したところ、末梢組織に発現している4種のGRK（GRK2、GRK3、GRK5およびGRK6）のうち、GRK6のみが食食に関与していることを見出した。これまでに、食食の過程でGPCRに焦点を当てた報告は、死んだ細胞から流出してくるヌクレオチド（UDP）を認識するプリン受容体（P2Y6とP2Y2）の関与およびホスファチジルセリンと直接結合する食食細胞に発現しているBAI-1受容体の食食への寄与である。これら食食に関与するGPCR（P2Y6およびP2Y2）およびBAI-1は、GRK6を介した経路とは無関係であったことから、GRK6を介した食食経路は新たな経路であることが示唆された。

2. 研究の目的

食食は、生体内の恒常性を維持するうえで重要な役割を果たしている。これまでの報告から、食食を仲介する過程には3つの経路

(Abl/ Abi シグナル経路、WLMO/ DOCK180/ Rac シグナル経路および ABC/ MFGF10/ GULP/ Dynamin シグナル経路) が存在すると報告されている。申請者は、予備検討ながら GPCR の活性調節を行うとのみ考えられてきた GRK のうち、GRK6 が食食を仲介しているという知見を得た。GRK6 を介した食食過程を明らかにすることで、新たな食食シグナル経路を確立できるのみでなく、GPCR の調節にのみ関わっていると考えられてきた GPCR キナーゼが GPCR の活性とは独立した細胞機能に関与していることを示すことができる。本研究の目的を、GRK6 を介した食食のメカニズムとその破綻によって引き起こされる生体応答を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

GPCR の調節に働くと考えられている GPCR キナーゼの一種 (GRK6) が、キナーゼ活性依存性に食食に関与していることを見出した。本研究では、アポトーシス細胞の食食における受容体キナーゼ (GRK6) の役割を確立するために以下の実験を行った。

- (1) これまでに知られている 3 つの食食シグナル経路 (Abl/ Abi シグナル経路、ELMO/ DOCK180/ Rac シグナル経路および ABC/ MFGF10/ GULP/ Dynamin シグナル経路) との関係をもドミナントネガティブ体の発現や siRNA 処置などにより検討した。
- (2) GRK6 の基質なるタンパク質をプロテオミクスの手法により検討した。
- (3) 培養細胞のみでなく生体内の細胞でも GRK6 が食食を仲介していることを、GRK6 ノックアウト (GRK6-KO) マウスおよび野生型マウスよりマクロファージを単離し、食食活性を検討した。
- (4) 食食の過程が損なわれると、自己免疫疾患を発症することが報告されていることか

ら、GRK6-KO マウスでの自己免疫疾患マーカー (抗 double strand DNA 抗体) を測定した。(5) 生体内の組織を検討し、異常の見られた脾臓での GRK6 の役割を解析した。

4. 研究成果

GRK6 の食食における役割解析および GRK6 の機能低下によって起こる応答について以下の結果を得た。

- (1) GRK6 を介した食食の過程とこれまでに報告されている 3 種の食食経路 (Abl/ Abi、ELMO/ DOCK180 および ABC/ MFGF10/ GULP/ dynamin シグナル経路) との関係を検討したところ、GRK6 を介した経路は、これら 3 種の経路とは独立していることが明らかになった。
- (2) GRK6 が相互作用する分子として、GIT と Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) を同定した。これら分子との相互作用の結果、最終的に Rac1 が活性化され食食の促進が生じていた。しかしながら、GRK6 が直接 GIT や ERM をリン酸化しているのかは現時点では明らかにできなかった。
- (3) 培養細胞のみでなく生体内の細胞でも GRK6 が食食を仲介していることを、GRK6 ノックアウト (GRK6-KO) マウスおよび野生型マウスよりマクロファージを単離し、食食活性を検討したところ、GRK6-KO マウスより単離したマクロファージでは、野生型に比べ食食能が低下していた。
- (4) 野生型および GRK6-KO マウスの自己免疫疾患マーカー (抗二重鎖 DNA 抗体) を測定したところ、生後 40 週では抗二重鎖 DNA 抗体の濃度が上昇していることを見出した。ヒトの場合、自己免疫疾患を発症する割合は女性の方が高い。しかしながら、マウスでは雌雄の間で、その割合に有意な差は見られなかった。
- (5) アポトーシスを起こした B 細胞は脾臓の

白脾髄に存在する舞う黒ファージによって貪食される。野生型およびGRK6-KOマウスの脾臓を調べたところ、マクロファージによって貪食されずに残っているアポトーシス細胞の数が、GRK6-KOマウスでは野生型に比べて多く観察された。一方、老廃赤血球は赤脾髄に存在するマクロファージによって処理される。GRK6-KOマウスの赤脾髄では、赤血球が処理されないために鉄の蓄積が増加していた。

これらの結果は、GRK6がアポトーシス細胞の貪食を仲介する新たな分子であり、機能の低下は自己免疫疾患の発症や赤血球のリサイクリングに影響を与えることを示している。本研究によって、これまでGPCRの活性調節を行うのみと考えられていたGRKの生体内での新たな役割が明らかになった。

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 2 件)

1. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H: Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 287 (42): 35669-35677 (2012) doi: 10.1074/jbc.M112.357871.

2. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya N, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H: GRK6-deficiency in

mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Communications* 4:1532 (2013) doi: 10.1038/ncomms2540.

[学会発表] (計 2 件)

黒瀬等 (招待講演)

Gタンパク質共役型受容体のGタンパク質依存性と非依存性の細胞応答 (シンポジウム 55 「心臓・循環生理の新たな調節機構—三量体G蛋白質シグナルの新コンセプト—) 第90回日本生理学会大会 2013年3月29日 (金) タワーホール船堀

黒瀬等、仲矢道雄 (招待講演)

Gタンパク質共役型受容体の活性を調節する分子群の疾患での役割

シンポジウム 2S-04 「G蛋白質共役型受容体 (GPCR) およびGPCRキナーゼの機能不全によって引き起こされる疾患」

第85回資本生化学会大会 2012年12月15日 (土) 福岡国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒瀬 等 (KUROSE HITOSHI)

九州大学大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10183039