

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 5 月 30 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23790330
 研究課題名（和文）
 マクロファージの遺伝子発現を制御するアポトーシス細胞由来因子の同定
 研究課題名（英文）
 Identification of the factor released from apoptotic cells that regulates the gene expressions in macrophages
 研究代表者
 山口裕嗣（YAMAGUCHI HIROSHI）
 京都大学大学院医学研究科 助教
 研究者番号：10542970

研究成果の概要（和文）：

本研究では、アポトーシス細胞からAMPが放出されることを明らかにした。またこのAMPの放出はカスパーゼによる切断を受け開口したPanz1チャンネルを介することを明らかにした。放出されたAMPはマクロファージ上の酵素によりアデノシンに分解された後、マクロファージ上のアデノシン受容体を介して抗炎症性シグナルを伝達することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

I found that apoptotic cells released AMP via caspase cleaved-panx1 channel. Furthermore, I revealed that released AMP was converted to adenosine by CD73 on macrophages and, in turn, transduced the immunosuppressive signal to macrophages via adenosine A2 receptors.

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	2300000	690000	2990000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：免疫学 アポトーシス 生理活性

1. 研究開始当初の背景

アポトーシス細胞は、マクロファージにより速やかに貪食・処理される。これまでにアポトーシス細胞上に提示されて死細胞の認識を促進する因子、食細胞の遊走を促進する分泌因子が同定されている。貪食の過程においてアポトーシス細胞は、食細胞の遺伝子発現を変化させるシグナルも伝達すると考えられるが、その実体は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究は、アポトーシス細胞から放出されマクロファージの遺伝子発現を制御する因子が存在するという仮説のもと、その因子の同

定及びその因子を介したシグナルの生理的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)マクロファージをアポトーシス細胞(マウス T 細胞株 W3)の培養上清で刺激した後、遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイにより調べた。以下に詳細を述べる。

C57BL6J マウスより骨髓を回収する。赤血球を除去した後、M-CSF 存在下で1週間以上培養し、マウス骨髓由来マクロファージとする。マクロファージへの分化は、表面抗原 CD11b の発現を指標として確認した。次いで、

マウス T 細胞株 W3 を Fas ligand 存在下で培養することによりアポトーシスを誘導する。このアポトーシス細胞培養上清でマウス骨髄由来マクロファージを刺激した後、RNA を回収しマイクロアレイ解析に供した。

(2) アポトーシス細胞培養上清を LC-MS 解析に供し、そこに含まれる低分子化合物を網羅的に同定した。以下に詳細を述べる。

アポトーシスを誘導した W3 細胞の培養上清をメタノール・クロロホルム処理によりタンパク質・脂質を除去した。凍結乾燥後、蒸留水に再懸濁させたサンプルを LC-MS メタボローム解析に供した。

(3) (1) で分かった遺伝子の発現量変化を指標とし、(2) で得られた候補因子の絞り込み・同定を行った(以下因子 X)。以下に詳細を述べる。

マウス骨髄由来マクロファージを(2)で得られた候補因子標品(10 μM)を含む培地で培養後、RNA を回収する。次いで、定量的 real time RT-PCR 法により各種遺伝子の発現量変化を観察した。ここでは、(1)の結果から Thbs1 遺伝子及び Nr4a 遺伝子を指標として用いた。

(4) 因子 X の放出機構の解析を行った。

(5) 因子 X によるシグナルの生理的意義について検討する。アポトーシス細胞の食食はマクロファージに抗炎症性のシグナルを伝達することが知られているため、特に炎症時の因子 X によるシグナルに着目して検討する。以下にその詳細を述べる。

因子 X の分解酵素あるいはレセプターのアンタゴニスト存在下で、アポトーシス細胞培養上清とマクロファージを共培養し、上清中に分泌されるサイトカインを測定する。また因子 X の受容体を欠損したマウスに炎症を起こさせると、炎症が遷延するか調べる。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄由来マクロファージとアポトーシス細胞培養上清を共培養後、発現量に変化した遺伝子を下の表に示した。

Gene Symbol	Induction fold
Nr4a2	44
Egr3	37
Nr4a1	36
Nr4a3	30
Thbs1	26
Il1beta	23
Egr2	15

Nr4a 遺伝子は炎症性サイトカインの発現を抑えるという報告、また Thbs1 タンパク質は抗炎症性サイトカインである TGFβ を活性化するという報告があることから、アポトーシス細胞の培養上清には、マクロファージに抗炎症性のシグナルを伝える因子が含まれることが示唆された。

(2) 次いで、LC-MS 解析により同定されたアポトーシス細胞中に含まれる低分子成分を以下の表に示した。

Name	Base peak intensity
cytidine	253387
AMP	159565
inosine	125507
guanine	100830
hypoxanthine	96699
uridine	85841
guanosine	81331
taurine	53787
UMP	29927
CDP-choline	28287
CMP	17520

これまでアポトーシス細胞から放出される低分子化合物を網羅的に解析した報告はほとんどない。本研究では、核酸や塩基成分がアポトーシス細胞から大量に放出されることを初めて明らかにした。

これらの化合物のうち、マクロファージの遺伝子発現を変化させる活性を持つ因子は AMP だけであった。

しかし、生体内では様々な臓器や器官において常にアポトーシスが起きており、またマ

クロファージ以外にも種々の細胞が存在することから、今回アポトーシス細胞培養上清中に見出された他の化合物がマクロファージ以外の細胞に対して何らかの生理活性を持つことは考えられる。今後のさらなる研究が期待される。

(3)アポトーシス細胞からの核酸放出の機序として、Panz1 チャンネルの開口を考えて実験を行った。

実際に、Panz1 阻害剤存在下でアポトーシスを誘導した W3 細胞の培養上清中には AMP が検出されなかった。また Panz1 遺伝子を欠損したマウスから調製した胸腺細胞にアポトーシスを誘導しても AMP の放出は起こらなかった。

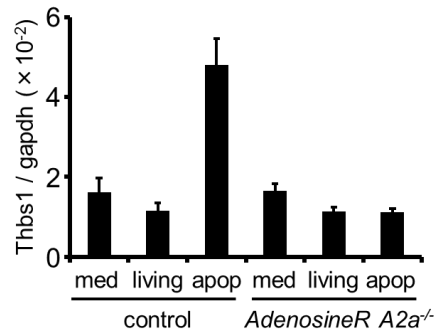
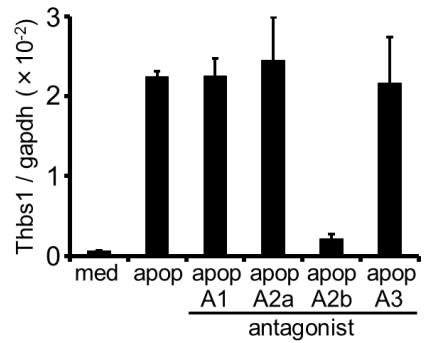
次いで、アミノ酸配列を解析した結果、Panz1 チャンネルの C 末端にはカスパーゼによる切断を受ける配列があることが分かった。そこでカスパーゼによる切断が起こらないような変異を導入した Panz1 遺伝子を W3 細胞に過剰発現させ、アポトーシスを誘導した後、培養上清中の AMP を定量した。その結果 AMP の放出が阻害されていることが分かった。

以上の結果は、アポトーシス時に活性化されたカスパーゼが Panz1 チャンネルの C 末端を切断することにより Panz1 チャンネルが開口し、AMP の放出が起こることを示唆するものである。

細胞が生きている状態では Panz1 の開閉がどのように制御されているのか、また生細胞で Panz1 チャンネルが開口した際にはどのような化合物が放出されるのか等についてはまだほとんど報告例がなく、今後の研究の進展が期待される。

(4)各種阻害剤を用いた実験から、アポトーシス細胞より放出された AMP はマクロファージ上の酵素 (CD73) によりアデノシンに分解されることが分かった。

またマクロファージをアデノシン標品で刺激すると Thbs1 遺伝子の発現が上昇すること、その上昇はアデノシン受容体のアンタゴニスト存在下では消失すること、またアデノシン受容体遺伝子を欠損するマウスより調製したマクロファージはアポトーシス細胞培養上清との共培養で Thbs1 遺伝子が活性化しないこと等(下図)から、(1)のマイクロアレイ解析で示された各種遺伝子の発現量変化はアデノシンを介したシグナル伝達によるものであることが分かった。

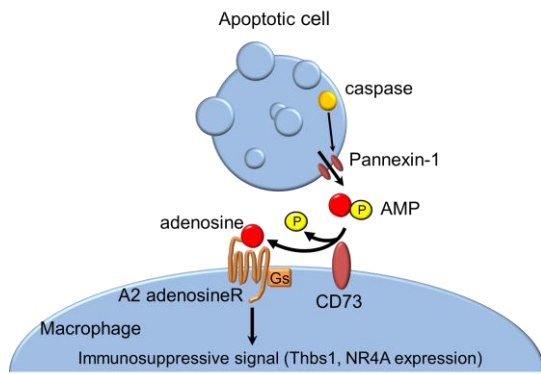


(5)次いで、このアデノシンによるマクロファージへのシグナル伝達がどのような生理的意義を持つか調べた。(1)で述べたようにアデノシンで発現が誘導される遺伝子の多くが抗炎症性のものであることから、アポトーシス細胞からの AMP 放出は生体内で過剰な炎症が起きるのを防ぐ作用があると考えた。

マウス腹腔に酵母細胞壁成分である zymosan を投与すると急性炎症が起きる。投与後、6 時間をピークとして腹腔内の TNFα や IL-6 などの炎症性サイトカインの濃度が上昇する。アデノシン受容体遺伝子および Panz1 遺伝子を欠損するマウスの腹腔に zymosan を投与し、腹腔内の炎症サイトカイン濃度の変動を観察した結果、これらのマウスでは野生型マウスに比べ炎症性サイトカインの濃度が下がり始める時期が遅くなり、炎症が遷延していることが分かった。

以上の結果より、アポトーシス細胞からの Panz1 チャンネルを介した AMP 放出は、マクロファージに抗炎症性のシグナルを伝達していることが示唆された。

以下に本研究で得られた成果をまとめた図を示した。



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)

[学会発表] (計 1 件)

1. 13th International TNF Conference (TNF2011)

ポスター発表