

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570210

研究課題名(和文) CD36を中心とした多量体形成と信号伝達プラットフォームのメソスコピック解析

研究課題名(英文) Mesoscopic analysis of CD36 clustering receptors and signal transduction in innate immune cells.

研究代表者

桑田 啓貴 (Kuwata, Hirotaka)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：60380523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果としては、自然免疫受容体TLR2のリガンドを蛍光標識する方法を検討してきたが、結果として1分子イメージングの資料として使用することの出来るものを作製することは出来なかった。リガンドを蛍光色素で標識することに関しては、いくつかの工夫により達成することができた。しかし、受容体を発現していることが分かっている生細胞にリガンドを加えても、適切な結合を見ることが出来なかった。この原因としては、TLRとリガンドの結合は事前に想定していたよりも結合力が弱く、リガンドの疎水性の変化が受容体との結合に強く影響したのではないかと考えられている。

研究成果の概要(英文)：As a result, we could not prepare the ligand which is labeled with fluorescent with appropriate ratio with ligand molecules. We now hypothesizes that non appropriate ratio labeling have caused the inaccessibility of ligand to receptors. We have tried to get the suitable way to label the receptor with the different approach using monoclonal antibody which are now available as a commercial product.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：免疫細胞 1分子イメージング メソスコピック解析 脂質リガンド

1. 研究開始当初の背景

高脂血症では血液中のコレステロールなどの脂質濃度が増加し、いわゆる悪玉コレステロールと呼ばれる低比重リポタンパク質 (LDL) が体内の血管壁に付着するなどし、動脈硬化症を引き起こす。さらに病態が進行すると脳梗塞や心筋梗塞などの命に関わる危険な病気へと悪化する。病理的あるいは疫学的研究によりとりわけ酸化 LDL などの陰性荷電型変成 LDL が動脈硬化の最大のリスクファクターとなっている。自然免疫系細胞は細胞表面に発現しているスカベンジャー受容体により細胞内にこれらの変成 LDL を取り込む。特に CD36 はノックアウトマウスなどの研究から変成 LDL の取り込みに重要な働きを有していることが判明している。CD36 は自然免疫受容体の中でも特異的な性質を有しており、アルツハイマーの原因物質であるベータアミロイドやマalaria感染赤血球などの様々なリガンドと結合することが知られている。このメカニズムは未だに不明であるが、推測として様々な補助受容体を取ることでリガンドの多様性に対応しているのではないかと考えられている。これまでの研究では、インテグリンやテトラスパニンなどが補助受容体となることが知られている。その他にも自然免疫受容体の1つ TLR2 などともヘテロ多量体を形成することが出来ると考えられている。CD36 がどのようにこれらの受容体とヘテロな多量体を形成することが出来るのかについては未だ十分な解析がなされておらず、またこれを解明することにより高脂血症などの発症メカニズムが解明されるのではと考えられている。

2. 研究の目的

スカベンジャー受容体は高脂血症の原因となる血液中の余剰脂質のクリアランスに必要である。変成 LDL 特異的スカベンジャー受容体 CD36 は自然免疫細胞の中でもマクロファージ表面に発現しており、リガンド脂質の取り込みを行う。リガンドと結合し細胞内への取り込みを行う際、CD36 は多量体を形成すると考えられているが、この多量体形成メカニズムに関しては未だ不明である。そこで本研究課題では、1 分子イメージングの手法を用いて、CD36 ヘテロ多量体の構成分子および多量体形成のメソスコピックな解析を行い、自然免疫細胞による血清脂質クリアランスと高脂血症悪化の機序解明が重要と考えられた。

3. 研究の方法

京都大学 iCeMS において同時二色の 1 分子イメージングが可能な Laser TIRF および超高感度 CCD カメラを用いて CD36 とその他の補助受容体のマクロファージ細胞表面における 1 分子イメージングを行うことを想定した。TLR2 の蛍光イメージングは特異的リガンドを標識することでイメージングすることを目指した。CD36 自体は特異的な抗体が市販で購入することが出来るのでこれを用いる。CD36 抗体はパピンを用いて切断し Fab フラグメントを作製し、これに蛍光標識することでイメージングを行う。

実験に使用する細胞は最終的には自然免疫細胞、マクロファージを用いることとする。ただし、条件検討のため、293 細胞や Hela 細胞などを用いることも検討する。

2 色(緑:波長 488nm、赤:波長 594nm)での同時の 1 分子イメージングではまず 3 秒程度のタイムコースで観察を行い、CD36 と共役分子候補との短時間(1-100 ミリ秒)の結合を検出する。これに必要な高感度カメラシステムは既に京都大学の iCeMS で開発されており、細胞膜上の受容体の 1 分子運動を最大 0.1 ミリ秒の時間分解能(1 秒あたり 10,000 コマの画像を取得)でそれぞれの分子を追跡することが可能である。

当初の計画としては TLR2 以外にインテグリンファミリー (CD11b/CD18) やテトラスパニンファミリー (CD9) などとの相互作用も検討するよていであった。今回の課題では、TLR2 の標識には特異的リガンド(FSL-1)を用いることと下。この理由としては、市販の抗体で TLR2 をうまく標識することが出来るものがないためである。また、1 分子イメージングの研究では抗体をパピンで処理し、Fab にし一価の抗体にする必要がある。抗体を酵素で処理したあとに抗体の特異的結合能が損なわれることも多いため、リガンドを標識する方法を優先的に検討することとした。リガンドにはアミノ酸配列としてリシンが含まれているのでこれに蛍光物質を共有結合で結合させることとする。

使用する蛍光物質としては、顕微鏡を保有している iCeMS の藤原敬宏講師より技術的なアドバイスを得た。Atto 594 などが過去に実績があるとのことなので、これらを使用することとした。

4. 研究成果

自然免疫受容体 TLR2 のリガンドを蛍光標識する方法を検討してきたが、結果として1分子イメージングの資料として使用することの出来るものを作製することは出来なかったため、発表に至らなかった。リガンドを蛍光色素で標識することに関しては、いくつかの工夫により達成することができた。しかし、受容体を発現していることが分かっている生細胞にリガンドを加えても、適切な結合を見ることが出来なかった。この原因としては、TLR とリガンドの結合は事前に想定していたよりも結合力が弱く、リガンドの疎水性の変化が受容体との結合に強く影響したのではないかと考えられている。もともと、本研究課題でターゲットにしたTLR2リガンドであるFSL-1はマイコプラズマ由来のジアシルリポペプチドであり、疎水性の高い物質であることは予想されていたが、過去にFSL-1を蛍光標識し、リガンドとして利用した研究報告も複数の研究室から行われており、実現可能性は高いと考えていた。実際は、1分子イメージングのレベルでの蛍光顕微鏡観察を行うにあたり、正確にリガンドと蛍光物質を等比で蛍光標識することは困難であった。別の手段として検討したTLR2のモノクローナル抗体によるイメージングは、国内の研究者との共同研究により過去に樹立された抗体を入手することを検討したが、入手出来なかった。ただ、研究開始当初は受容体に対して特異的に結合することの出来る抗体は市販されていなかったが、現在は市販されており、研究実施期間終了後ではあるが、1分子イメージングに使用することが可能か検討していく。また、TLR2の補助受容体の1つであり、代表者が以前に取り組んでいた分子であるCD36の1分子イメージングは時間的制約から行うことが出来なかったが、これも引き続き検討していく。

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5件)

1. Role of protease maturation lipoprotein in osmoadaptation of *Streptococcus mutans*.
Kunii M, Arimoto T, Hasegawa T, Kuwata H, Igarashi T.
FEMS Microbiol Lett. 2014 Jul;356(1):45-52. (査読有り)

2. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci.
Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S.
PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e88136. (査読有り)

3. *Rothia dentocariosa* induces TNF-alpha production in a TLR2-dependent manner.
Kataoka H, Taniguchi M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Kuwata H.
Pathog Dis. 2014 Jun;71(1):65-8. (査読有り)

4. Bacterial sphingophospholipids containing non-hydroxy fatty acid activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance.
Fujiwara N, Porcelli SA, Naka T, Yano I, Maeda S, Kuwata H, Akira S, Uematsu S, Takii T, Ogura H, Kobayashi K.
Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1831(6):1177-84. (査読有り)

5. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function in human primary macrophage.
Kuwata H.
Seikagaku. 2012 Dec;84(12):1012-6. (査読無し)

[学会発表](計2件)

1. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(札幌)
"Rothia dentocariosa induces TNF-a production in a TLR2 dependent manner"
片岡嗣雄、深町はるか、有本隆文、森崎弘史、桑田啓貴
2014年6月19,20日
2. 第86回日本細菌学会総会(幕張)
"Rothia detocariosa induces TNF-a production in a TLR2 dependent manner"
片岡嗣雄、有本隆文、谷口誠、深町はるか、森崎弘史、張家誠、山本松男、桑田啓貴
2013年3月18-20日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

特になし

取得状況(計 0 件)

特になし

〔その他〕

特になし

5. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田啓貴 (Kuwata Hirotaka)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：60380523