

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790749

研究課題名(和文)ホスホリパーゼA2を介するマクロファージの変性LDL取込みにおける新たな機序解明

研究課題名(英文) Novel insights of the mechanism in uptake of modified-LDL in macrophage through phospholipase A2

研究代表者

藤岡 大佑 (FUJIOKA, Daisuke)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：70377513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：shNRAにより、V型sPLA2をノックダウン(KD)したRaw264.7細胞株を確立した(マウスマクロファージ系細胞)。この細胞株では酸化LDLの細胞内への取り込み能と、その後の分解処理能が野生型と比較して遅延、低下しており、この現象を規定している細胞骨格であるアクチンの重合度、Rho GTPaseの活性もV型sPLA2 KD細胞株において低下していた。これらの現象を説明するためのシグナルをスクリーニングしたところ、V型sPLA2 KD細胞株において、Srcの発現と活性が低下しており、V型sPLA2蛋白がSrcのプロモーター領域と相互作用してSrcの発現を調整している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a stable cell line which expresses low levels of group V sPLA2 with the use of shRNA-knockdown method in Raw264.7 mouse macrophage cell line. This cell line showed delayed- and decreased-activities in uptake and degradation of oxidized-LDL, and these cells also showed decreases of the level of actin polymerization and the activity of Rho GTPase which regulate the uptake of oxidized-LDL into the cells, in comparison with wild type cell line. The expression level and the enzymatic activity of Src were reduced in group V sPLA2-knockdown cell line, and these phenomena suggested that group V sPLA2 interacts with the promoter region in Src and regulates the expression of Src.

研究分野：基礎循環器病学

キーワード：ホスホリパーゼA2 酸化LDL Src マクロファージ ノックダウン 過剰発現 endosome

1. 研究開始当初の背景

PLA2 はアラキドン酸カスケードの最上流に位置する酵素であり、アラキドン酸に由来する様々なエイコサノイドが炎症性疾患の発生・病態に深く寄与している。また sPLA2 は sPLA2 受容体のリガンドとなり細胞内シグナル伝達を担うなど、酵素活性非依存的にも様々な疾患の発生・病態に関与している可能性がある。

PLA2 が動脈硬化の発生・病態に関与していることは多くの報告で証明されている。実際、V 型 sPLA2 ノックアウトマウスにて動脈硬化の発生が抑制される。これまで、PLA2 はその酵素活性作用により生じたエイコサノイド等の脂質メディエーターまたは LDL の修飾を介して動脈硬化の発生に関わると信じられてきた。しかしながら、PLA2 の酵素活性阻害剤の投与による動脈硬化の抑制は証明されておらず、われわれの WHHL ラビットを用いた研究でも sPLA2 の酵素活性阻害剤は動脈硬化を抑制できなかった。よって sPLA2 による酵素活性を介した LDL の修飾・酸化作用による動脈硬化への関与は否定的と考えざるを得ない。

受容体に結合した変性 LDL が細胞内に取り込まれるには、細胞骨格タンパクであるアクチンが重合して lamellipodium を形成することが必要であり、その形成には Src-Syk シグナル、guanosine nucleotide exchange factor-Rho GTPase シグナルの活性化が重要である。この 10 年間で、V 型 sPLA2 が酵素活性非依存的にマクロファージによる異物（バクテリア等）に対する貪食能を制御していることが明らかとなった（J Biol Chem 2006; 281: 6691, J Immunol 2009; 182: 4891）。我々も V 型 sPLA2 のノックアウトマウス腹腔内マクロファージを用いて同様の実験を行い、異物が貪食される際のアクチンの重合に V 型 sPLA2 が酵素活性非依存的に重要な役割を有しているという知見を得た（未発表）。以上から sPLA2 が酵素活性非依存的に細胞骨格アクチンの動態に強く関わっており、これがマクロファージの変性 LDL 取り込み能に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

前述のように、sPLA2 が酵素活性非依存的に変性 LDL のマクロファージ細胞内への取り込みに関与することによって動脈硬化が誘導されるという仮説を証明するために、sPLA2 の酵素活性非依存的作用によりマクロファージが変性 LDL を取り込むことの証明とそれに関わる経路（細胞内シグナル含む）を解明することがこの研究の目的である。

酵素活性非依存性は酵素活性を失活した変異型 sPLA2 を用いることで証明する。sPLA2 の酵素活性非依存的作用機序に sPLA2 受容体が関与している可能性があるが、この点に関しては本研究では探索しない。

3. 研究の方法

(1) PLA2 発現の確認

野生型マウスの腹腔マクロファージでの各 PLA2 アイソザイムの発現を確認する。培養腹腔マクロファージをアセチル化 LDL、native LDL、PBS とともに incubation し、発現の増減を確認する。

(2) マクロファージによる変性 LDL 取り込みへの sPLA2 の関与の証明と関与する sPLA2 アイソザイムの同定

変性 LDL の取り込み能を sPLA2 の各アイソザイムのノックアウトマクロファージ (KO-M) と野生型マクロファージ (WT-M) にて比較検討する。蛍光標識したアセチル化 LDL を含んだ培養液にてマクロファージを培養し、細胞内に取り込まれたアセチル化 LDL を定量する。

(3) sPLA2 を介する変性 LDL 取り込みにおいて、sPLA2 は酵素活性非依存性に関与することの証明

実験 2. の sPLA2 KO-M と WT-M の取り込み能の比較検討において、取り込み能が低下した sPLA2 アイソザイム KO-M に、当該 sPLA2 アイソザイムの酵素活性を失活した変異型 sPLA2 のリコンビナント蛋白を添加することで、取り込み能がレスキューされることを確認する。さらに、取り込みに関与する sPLA2 アイソザイムの酵素活性失活変異型 sPLA2 を当該 sPLA2 KO-M に強制過剰発現させることで取り込み能が改善することを確認する。それぞれの sPLA2 アイソザイムの変異型 sPLA2 は site-directed mutagenesis の技術により作成したものを既に現有している。過剰発現にはレンチウイルスによるトランジェントトランスフェクション法を用いる。

(4) sPLA2 を介する変性 LDL 取り込みに関与するスカベンジャー受容体タイプの検索

変性 LDL 取り込みに関与するとされる複数のスカベンジャー受容体タイプ (scavenger receptor A, CD36, CD68 等) の中で、sPLA2 が関わるスカベンジャー受容体タイプを明らかにする。

実験 2. において、変性 LDL の取り込み能に関与することが示された sPLA2 アイソザイムの酵素活性失活変異型を強制過剰発現させたマクロファージを用いて、各スカベンジャー受容体 (scavenger receptor A, CD36, CD68) を RNA 干渉によりノックダウンさせる。その後同様の変性 LDL の取り込み実験を行い、取り込み能が一段と低下していた場合、その時ノックダウンしていたスカベンジャー受容体が sPLA2 の関与するスカベンジャー受容体となる。

(5) sPLA2 が関与するマクロファージの変性 LDL 取り込み経路と sPLA2 による変性 LDL

取り込み能の制御機序の解明

アクチン重合

アクチン重合はエンドサイトーシスにおける細胞内現象の根幹であり、これによりエンドソームの形成、細胞内輸送が行われている。したがってアクチン重合度を評価することは、変性 LDL 取り込み能そのものを評価するもう一つの確認方法であり、さらに以下に示すシグナルを検討する根拠となる。アセチル化 LDL がスカベンジャー受容体を介してマクロファージ内に侵入する際のアクチンフィラメントの重合度を、WT-M と各 sPLA2 KO-M にて比較する。

スカベンジャー受容体からアクチン重合につながるまでの細胞内シグナル伝達経路の同定

まずアクチンの再構成に關与する上流シグナルにあたる Rho GTPase の種類を同定する。候補となる Rho GTPase (Cdc42、Rac-1、Rho) の活性化を sPLA2 KO-M と WT-M にて比較検討することで、sPLA2 が關わる Rho GTPase を同定することができる。アセチル化 LDL にて刺激した WT-M と sPLA2 KO-M のホモジネートを GTP 結合タンパクにてプルダウンし、その後 SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを用いて、活性化した (GTP と結合した) 各 Rho GTPase を検出同定する。次に、Rho GTPase 活性化の上流にあたる Guanosine nucleotide exchange factor (GEF) の活性化を、Vav-1 のリン酸化を見ることにより比較検討する。さらに、実験 4. で判明したスカベンジャー受容体からダウンストリームの GEF 活性化につながるシグナル経路を同定する。Src-Syk-PI3K が有力な候補であるが、場合によってはその他 (JNK、P38 など) の経路も検討する必要がある。アセチル化 LDL で刺激した WT-M と sPLA2 KO-M のホモジネートをウェスタンブロッティングし、各シグナルのリン酸化を確認することで同定することができる。

4. 研究成果

当初、野生型と V 型 sPLA2 のノックアウトマウスから採取した腹腔内マクロファージを使用し、マクロファージによる酸化 LDL 取り込み実験を開始した。しかしながら当該細胞が初代培養細胞であり、採取できる細胞数が限られていたこと、また細胞の状態が安定せず毎回同様な状態の細胞が得られなかったことなどから、初代培養細胞の使用を断念し、マウスマクロファージの細胞株である Raw264.7 細胞を使用することとした。

mRNA 解析によると、Raw264.7 細胞中には V 型 sPLA2 は比較的発現を認めたが、その他の sPLA2 アイソザイムの発現はほとんど認められなかった。

そこで Raw264.7 細胞に、レンチウイルスベクターによる V 型 sPLA2 の shRNA を導入し、細胞株化した。これにより、野生型の細胞と V 型 sPLA2 のノックダウン (KD) 細胞が比較

可能である。この細胞で酸化 LDL 取り込み実験を行い経時変化を見たところ、V 型 sPLA2 の KD 細胞では野生型の細胞と比較して酸化 LDL を取り込んで消化処理する速度が遅延していることが観察された。また細胞内に取り込まれて early endosome へと運搬された酸化 LDL は、さらに late endosome へ転送されるが、V 型 sPLA2 KD 細胞では late endosome への運搬が遅延していた。これらの機序を解明するために、酸化 LDL 取り込み時のアクチン重合度 (細胞内輸送に密接に關与している) を各細胞群で比較したところ、V 型 sPLA2 の KD 細胞ではそれが低下していた (図 1)。

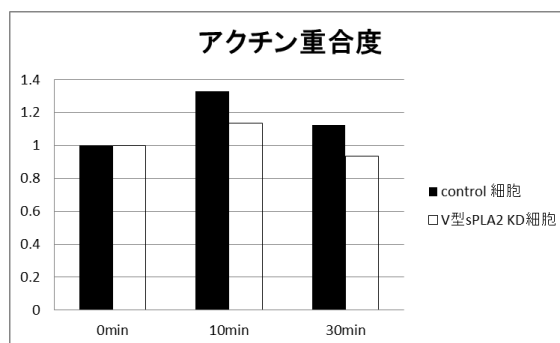


図 1

さらにアクチン重合を規定しているファクターである RhoGTPase の活性を pull-down 法により比較したところ、V 型 sPLA2 の KD 細胞株では野生株よりも低下していた (図 2)。

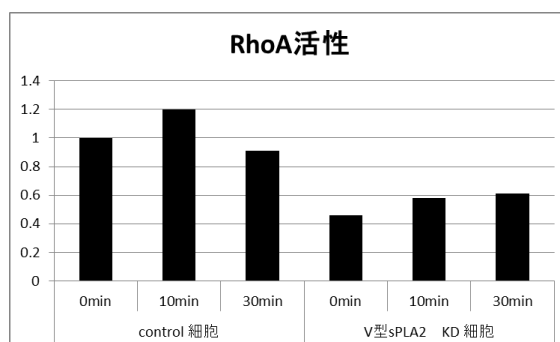


図 2

これらの現象を規定している細胞内シグナルをスクリーニングしたところ、V 型 sPLA2 KD 細胞では Src の発現が恒常的に低下しており、この酵素活性も低下していた。Src の発現を規定しているプロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし、野生型細胞と V 型 sPLA2 KD 細胞にトランスフェクションしてルシフェラーゼの発現を比較したところ、V 型 sPLA2 KD 細胞でルシフェラーゼの発現が低下していた (図 3)。また、このプロモーター領域を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、V 型 sPLA2 の蛋白を添加した際にゲルシフトが観察された。これらの結果は、V 型 sPLA2 が何らかの形で Src のプロモーター領域に作用し、Src の発現調

節に關与している可能性が考えられた。

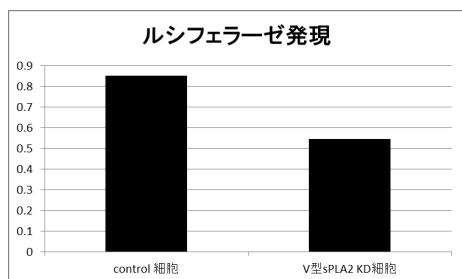


図 3

これらの事象は、V 型 sPLA2 がマクロファージにおいて酸化 LDL を取り込んで泡沫化する現象を正に調整していることを示している。このことは生体内で V 型 sPLA2 を選択的に阻害することにより、動脈硬化が抑制される可能性があることを示唆するものである。

研究計画では、この V 型 sPLA2 による酸化 LDL 取り込み調節が酵素依存性か否かを確認する実験（酵素活性を失った mutant の V 型 sPLA2 を Raw264.7 細胞に発現させて実験を行う）と、この取り込みに関与する受容体の探索を行う予定であったが、V 型 sPLA2 KD 細胞株の確立に想定外の時間を要したために完遂するには至らなかった。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
藤岡 大佑 (FUJIOKA, Daisuke)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：70377513