

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450521

研究課題名(和文)新規危険信号分子アラミンの探索

研究課題名(英文) Secretome analysis for the search for novel danger signal alarmins in ATP-stimulated macrophages

研究代表者

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI, Takato)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・上級研究員

研究者番号：20292518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：危険信号分子アラミンとは、細菌感染や傷害等の生体の危険を速やかに伝達し自然免疫系を活性化する生体内由来因子の総称である。本研究では、ATP刺激したマクロファージから細胞外に放出される蛋白質を網羅的に解析(セクレトーム解析)し、同定された蛋白質の自然免疫系における役割を明らかにすることで、新しいアラミンを探索した。脳マクロファージ・ミクログリア細胞株を用いたセクレトーム解析から、640種類の蛋白質をアラミンとして機能する可能性のある候補分子とした。その中で、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)について、その非典型的分泌機構や細胞外での自然免疫調節作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alarmins are endogenous molecules that act as danger signals to promote inflammation or innate immune response. Since they are mainly secreted from macrophage-related cells, we performed P2X7 receptor-secretome analysis using ATP-stimulated mouse microglial cells, known as brain macrophages, to search for novel alarmins. We have identified 640 different proteins as candidate molecules that may act as alarmins. Among them, we demonstrated the unconventional secretion pathway and innate immunomodulatory functions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in microglial cells. The findings suggest that GAPDH secreted from macrophages may act as a mediator of innate immune system.

研究分野：農学

キーワード：アラミン マクロファージ P2X7受容体 GAPDH

1. 研究開始当初の背景

生体には細菌感染や傷害等の危険に速やかに対処する防御機構(自然免疫)が備わっている。この生体防御機構で重要な役割を持つ細胞の1つがマクロファージである。マクロファージは危険を感知し活性化されるとサイトカイン等様々な生理活性物質を放出し、自然免疫系を活性化して生体の恒常性維持に寄与する。

近年、通常細胞内で機能している分子が、組織が傷害を受けた際などに細胞外に放出され異物として認識されることにより、自然免疫系の活性化に積極的に関与するシステムが生体内に存在することが明らかにされている。これら生体の危険を伝達する内因性分子は危険信号分子(アラミン)と総称され、マクロファージはその主要な放出細胞として知られる。

現在までに、核蛋白質 High mobility group box 1 protein(HMGB1)、細胞内S100蛋白質、細胞骨格蛋白質 F-アクチンあるいは ATP などがアラミンとして報告されているが、未同定のアラミンも多く残されており、世界中でその探索が進められている。新規アラミンの同定は新しい自然免疫活性化機構の解明につながると共に、それをターゲットとした抗炎症薬等の開発にも重要な知見をもたらすと期待される。

アラミンとして機能する蛋白質には、細胞外への移行に必須なシグナル配列を持たないものが多く、非典型的分泌経路の関与が示唆されている。これに関して、マクロファージに多く発現するイオンチャネル型 ATP 受容体ファミリーの一つ P2X7 受容体(P2X7R)は非典型的放出機構を活性化し、炎症性サイトカイン・インターロイキン-1 β (IL-1 β)や HMGB1 などシグナル配列を持たない蛋白質の放出を誘導することが知られている。つまり、P2X7R 活性化後にマクロファージから細胞外に放出される蛋白質を同定し解析することで、新規アラミンを発見できる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージの P2X7R 活性化によって細胞外に放出される細胞内由来の蛋白質を網羅的に解析(セクレトーム解析)し、同定された蛋白質の放出機構及び自然免疫系における役割を明らかにすることで、新しいアラミンを同定することを目的とする。

また、P2X7R 活性化により細胞外へ積極的に放出される細胞内蛋白質の1つとして糖代謝酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を見出したので、GAPDH がアラミンとして機能す

るかについても検討した。

3. 研究の方法

- (1) マウス培養マクロファージ: 不死化細胞株として脳ミクログリア由来 MG6 細胞、肝臓クッパー細胞由来 KUP5 細胞を用いた。またマウス新生子脳より初代培養ミクログリアを調製した。
- (2) 細胞培養上清のセクレトーム解析: リポ多糖(LPS)処理した MG6 細胞を P2X7R アゴニストである ATP (5 mM) で 30 分間刺激した後、培養上清を回収した。その培養上清からトリクロロ酢酸沈殿で蛋白質を濃縮し、LC-MS/MS を用いたショットガン解析(アプロサイエンス社)を行った。
- (3) GAPDH 放出機構の解析: 24 ウエルプレートに播種したマクロファージを刺激し、培養上清に放出される GAPDH をウエスタンブロット法で検出した。この際に、P2X7R アンタゴニストや細胞内シグナル伝達阻害剤等を添加することで、GAPDH 放出における P2X7R 及び下流シグナルの関与を調べた。
- (4) 細胞外小胞の分画: 刺激後の細胞の培養上清を 1,200g で 30 分間遠心し、その上清をエキソソーム含有画分とした。さらに 10,000g で 1 時間遠心して、沈殿物をマイクロベシクル(粒径 100~1000nm)画分とした。上清をさらにエキソソーム単離キット溶液(インビトロジェン)で処理し、10,000g で 1 時間遠心して、沈殿物をエキソソーム(粒径 30~200nm)画分とした。最終的に残った上清をエキソソーム除去画分とした。
- (5) 敗血症モデルマウスの作製: マウス盲腸を結紮・穿刺した腹膜炎モデルを作製した。血清や腹腔液サンプルを経時的に採取し、GAPDH の産生動態を検討した。

4. 研究成果

- (1) MG6 細胞の培養条件を検討し、5 mM ATP で刺激した培養上清中のみ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の銀染色で蛋白質が検出される条件を決めた。その ATP 刺激後の培養上清から蛋白質を濃縮しセクレトーム解析を行った結果、640 種類の蛋白質が同定された。その中には、既にアラミンとして知られる HMGB1、S100 蛋白質、F-アクチンも含まれていた。また、これまでに細胞外への放出機構及び細胞外での機能が知られていない細胞内蛋白質も複数含まれていた。よって、これら

- 同定された蛋白質をアラミンとして機能する可能性のある候補分子として検討を進めた。
- (2) 予備実験において申請者らは、ATP 刺激で MG6 細胞から放出される細胞内蛋白質として GAPDH を見出ししていた。この知見はセクレトーム解析でも確認されたことから、GAPDH の非典型的分泌機構及び自然免疫応答調節作用について検討した。MG6 細胞あるいは初代培養マイクログリアからの GAPDH 放出は LPS 前処理によって顕著に促進された。また、P2X7R 活性化に伴うカスパーゼ 1 の活性化が GAPDH 放出に関与することが示唆された。さらに、ATP 刺激で培養上清中に放出されるエクソソームやマイクロベシクルに GAPDH の局在が確認されたことから、GAPDH 放出にこれら膜小胞が関与することが示唆された。同様に、他のマクロファージ細胞株である KUP5 細胞でも、ATP 刺激後の GAPDH 放出に膜小胞が関与することが示唆された (図 1)。また、細胞外に添加したヒト赤血球由来 GAPDH 蛋白質には、LPS による MG6 細胞の p38MAP キナーゼリン酸化を促進する効果があることが示された。これらの結果から、マイクログリア / マクロファージにおいて ATP-P2X7R 経路が関与する GAPDH の非典型的分泌機構の存在が示唆された。また、放出された細胞外 GAPDH は自然免疫系の調節に関与する可能性が推測された。

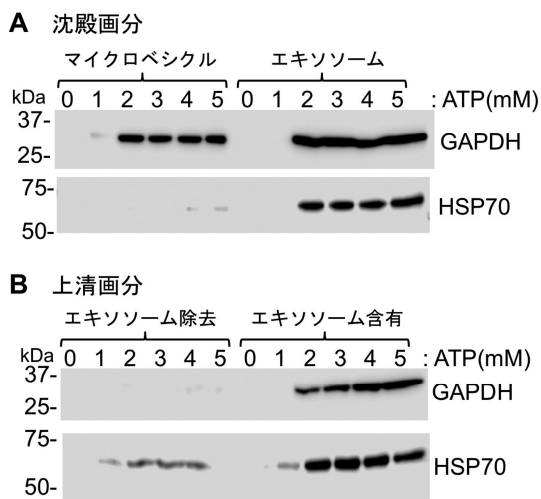


図 1 ATP 刺激による LPS 処理 KUP5 細胞からの GAPDH の放出。培養上清から細胞外小胞 (マイクロベシクルとエクソソーム) を分画した (A)。HSP70 はエクソソームマーカーとして用いた (A, B)。

- (3) 敗血症性腹膜炎モデルを作製し、*in vivo* での GAPDH の動態について検討した。その結果、マウス腹腔液中には定常的に一定量の GAPDH が存在し、腹膜炎の誘導に伴い GAPDH 量が減少する傾向にあることが分かった (図 2)。今後さらに *in vitro* 及び *in vivo* での解析を進めることで、炎症応答における細胞外 GAPDH の役割の解明が期待される。

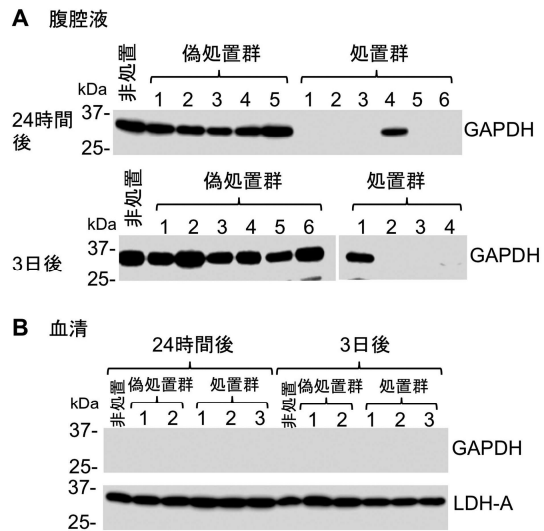


図 2 腹膜炎モデルマウスの腹腔液 (A) 及び血清中 (B) の GAPDH の産生動態。盲腸の結紮・穿刺処置後 24 時間及び 3 日後にサンプルを採取した。血清中には、GAPDH は検出されなかったが、細胞傷害マーカーである LDH-A は検出された (B)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Takenouchi T., Tsukimoto M., Hashimoto M., Kitani H. (2015) ATP-triggered unconventional secretion of GAPDH from macrophages: Its putative role as a modulator of inflammation. *Macrophage* 2:e1083. (査読有)

DOI:10.14800/Macrophage.1083

Takenouchi T., Tsukimoto M., Iwamaru Y., Sugama S., Sekiyama K., Sato M., Kojima S., Hashimoto M., Kitani H. (2015)

Extracellular ATP induces unconventional release of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from microglial cells.

Immunol. Lett. 167:116-124. (査読有)

DOI:10.1016/j.imlet.2015.08.002

Toki Y., Takenouchi T., Harada H.,

Tanuma S., Kitani H., Kojima S.,

Tsukimoto M. (2015) Extracellular ATP

induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1 β ,

HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death.

Biochem. Biophys. Res. Commun.

458:771-776. (査読有)

DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.011

Takenouchi T., Tsukimoto M., Hashimoto M., Kitani H. (2014) Inflammasome activation by danger signals: extracellular ATP and pH. *Inflammasome* 1:76-80. (査読有)

DOI:10.2478/infl-2014-0008

Takenouchi T., Suzuki S., Shinkai H., Tsukimoto M., Sato M., Uenishi H., Kitani H. (2014) Extracellular ATP does not induce P2X7 receptor-dependent responses in cultured renal- and liver-derived swine macrophages. *Results Immunol.* 4:62-67. (査読有)

DOI:10.1016/j.rinim.2014.07.002

〔学会発表〕(計3件)

竹之内敬人、月本光俊、佐藤充、木谷裕、ミクログリアにおける GAPDH の非典型的放出機構と自然免疫応答調節、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌

竹之内敬人、鈴木俊一、新開浩樹、月本光俊、佐藤充、上西博英、木谷裕、ブタ腎臓および肝臓マクロファージの単離・培養と P2X7 受容体機能解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2016 年 3 月 28 日、岡山

土岐勇介、小島周二、竹之内敬人、木谷裕、田沼靖一、月本光俊、肝マクロファージ/kupffer 細胞における P2X7 受容体の機能解析、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月 4 日、東京

〔図書〕(計1件)

Takenouchi T., Sekiyama K., Sugama S., Iwamaru Y., Kitani H., Hashimoto M. (2013) CHAPTER 15: Role of P2X7 Receptor Signaling in the Treatment of Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *EMERGING DRUGS AND TARGETS FOR PARKINSON'S DISEASE*, Royal Society of Chemistry (RSC) publishing, 339-358. (査読有)
DOI:10.1039/9781849737357-00341

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI Takato)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・上級研究員
研究者番号：20292518

(2)研究分担者

月本 光俊 (TSUKIMOTO Mitsutoshi)

東京理科大学・薬学部薬学科・講師
研究者番号：70434040