

# 研 究 報 告 書

## 「マクロファージの活性化調節による慢性炎症の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 佐々木 純子

### 1. 研究のねらい

活性化 MΦは機能の観点から炎症性メディエーターを産生する M1MΦと組織修復に関与する M2MΦの大きく2つに分類される。傷害部位から産生される液性因子により M1MΦあるいは M2MΦへと活性化され、炎症の起始, 増悪, 減弱, 終結の過程で重要な働きをする。慢性炎症を基盤とする生活習慣病やがんなどの病巣には, M1/M2MΦが存在し, 病態の進行に寄与することが明らかにされつつあり, MΦの活性化制御は慢性炎症に関わる病態の新しい治療戦略として期待される。

このような観点から近年, MΦの活性化を制御する細胞内因子についての解析が進められている。我々は MΦの活性化を制御する細胞内因子として, 新たにホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸( $\text{PIP}_3$ )に着目した。 $\text{PIP}_3$ は生体膜構成脂質の 0.01%にも満たない極微量なリン脂質であるが, 特異的に結合するタンパク質の局在や活性化を介して様々な細胞生理応答を調節する, 重要な情報伝達物質である。中でも血液細胞特異的に発現する  $\text{PIP}_3$  ホスファターゼである SHIP1 の欠損マウスでは, 線維化を伴う致死性の肺炎を 100%の確率で認め, 病態の発症には MΦの異常な活性化が関与することが示唆されている。しかし我々の検討では, SHIP1 欠損 MΦは既報とは異なる MΦへと活性化すること, さらに別の  $\text{PIP}_3$  ホスファターゼである PTEN 欠損 MΦは, SHIP1 欠損 MΦとは異なる MΦへと活性化するという予備知見を得た。そこで本研究では SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦの違いに着目し, 新規のイノシトールリン脂質解析技術の開発を通して, MΦの活性化を制御する  $\text{PIP}_3$  分子種を見出すとともに, その分子機構を解明する。そして  $\text{PIP}_3$  分子種による慢性炎症の制御を試みる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

論文投稿準備中なので, 一部名称を化合物 X と表記したことをご了承ください。

SHIP1 欠損 MΦは M1MΦの性質を強く持つ MΦへと活性化するのに対し, PTEN 欠損 MΦは M2MΦの性質を強く持つ MΦへと活性化することを見出した。MΦ特異的遺伝子欠損マウスを用いた解析から, これらの MΦは慢性炎症の根本原因ではないが, 慢性炎症病態を調節することを明らかにした。

$\text{PIP}_3$  分子種を定量的に検出可能とする新たな解析技術の開発に成功し, SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦでは異なる  $\text{PIP}_3$  分子種が蓄積することを見出した。各々の  $\text{PIP}_3$  分子種の下流ではそれぞれ分子 X と AKT が活性化され, その結果 SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦは異なる MΦへと導かれると考えられた。さらに  $\text{PIP}_3$  分子種の細胞内への直接導入は, MΦの活性化を制御し得ること, また, 生体レベルで  $\text{PIP}_3$  分子種を変動させると, SHIP1 欠損マウスの表現型が部分的に回復するという結果から,  $\text{PIP}_3$  分子種は MΦの活性化を規定し, 慢性

炎症を制御し得ることが示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「SHIP1 欠損 MΦ と PTEN 欠損 MΦ の性状解析」

PIP<sub>3</sub> 脱リン酸化酵素である SHIP1 と PTEN の遺伝子欠損骨髓細胞を用いて、M1/M2MΦ マーカーの発現解析と LPS 刺激に伴うサイトカイン産生について解析した。SHIP1 欠損 MΦ は M2 マクロファージマーカーである Arg 1 の発現は亢進したものの、その他の M2MΦ マーカー (Ym1, CD206, CD163) の発現はコントロールと比べて減少していた。また、IL-10 の発現低下、IL-12 の発現亢進、LPS 刺激による TNF-α 産生が亢進しており、SHIP1 欠損 MΦ は既報と異なり、M1MΦ の性質を強く持つ MΦ へ活性化すると考えられた。一方 PTEN 欠損 MΦ については上記 4 種の M2MΦ マーカーの発現亢進が認められ、IL-10 の発現亢進、LPS 刺激による TNF-α 産生が低下しており、M2MΦ の性質を強く持つ MΦ へ活性化すると考えられた。

SHIP1 欠損骨髓細胞はミエロイド系細胞への分化が亢進していること、また SHIP1 欠損マウスの個体内 (脾臓、肺、血中など) では MΦ の数が増加していること、T 細胞や B 細胞特異的 SHIP1 欠損マウスや W/W<sup>v</sup> マウスとの交配により肥満細胞を除去しても肺炎を発症することから、MΦ が肺炎の発症に関わることが示唆された。そこで肺炎発症・進行における SHIP1 欠損型 MΦ の役割を解析するために、MΦ の枯渇実験を行った。CD11b-DTR マウスを用いて SHIP1 欠損マウスより MΦ を除去すると、体重減少の抑制と生存期間の延長が認められ、SHIP1 欠損型 MΦ は少なくとも病態の進行に関与すると考えられた。しかしながら個体の小さいマウスにおいては、ジフテリアトキシンそのものの毒性が懸念されたため、SHIP1 flox マウスを新たに作出し、CD11b-cre トランスジェニックマウスを用いて MΦ 特異的 SHIP1 欠損マウス (CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup>) を作製した。ところが CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> は肺炎を発症せず、SHIP1 欠損型 MΦ は肺炎の根本原因ではないことが明らかとなった (図 1)。

SHIP1 欠損型 MΦ は慢性炎症を惹起しないが、慢性炎症病態を制御する可能性がある。この点を明らかにするために、M1/M2MΦ の機能が確立している高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性について、CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> マウスと CD11b-cre PTEN<sup>flox/flox</sup> マウスを用いて検討した。その結果コントロールマウスに比べ、CD11b-cre SHIP1<sup>flox/flox</sup> マウスでは脂肪組織における M1MΦ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) の増加と M2MΦ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) の減少が認められ、全身性のインスリン抵抗性が増悪していた。一方 CD11b-cre PTEN<sup>flox/flox</sup> マウスでは脂肪組織における M1MΦ の減少と M2MΦ の増加が認められ、全身性のインスリン抵抗性は改善した。以上の解析から、SHIP1 欠損型 MΦ と PTEN 欠損型 MΦ は慢性炎症を引き起こす根本原因ではないが、慢性炎症病態を修飾する MΦ であることを明らかにすることができた。

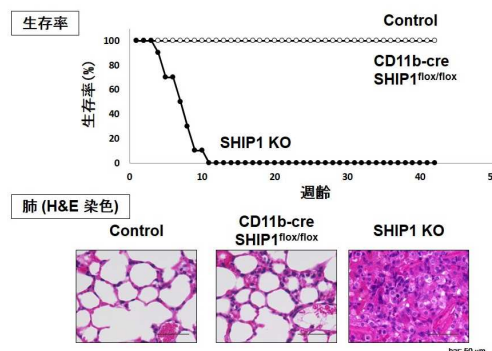


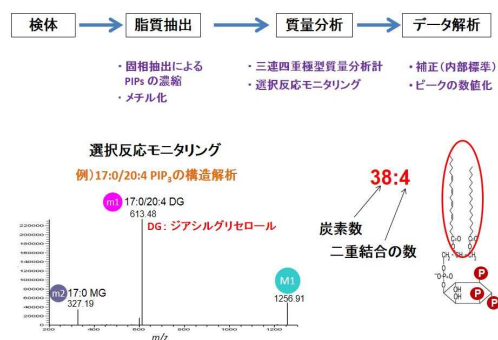
図1 MΦ 特異的 SHIP1 欠損マウスは肺炎を発症しない

## 研究テーマ B 「SHIP1 欠損 MΦと PTEN 欠損 MΦが異なる MΦへ活性化する分子機構」

SHIP1 と PTEN はともに  $\text{PIP}_3$  脱リン酸化酵素であるにも関わらず、各々の遺伝子欠損 MΦ が異なる MΦ へと活性化するのはなぜであろうか。その分子メカニズムとして、蓄積する  $\text{PIP}_3$  分子種の違いを予想した。これを解明するために、アシル基を保持した状態の  $\text{PIP}_3$  分子種を、定量的に検出可能とする新たな解析技術の開発に取り組んだ。固相抽出法による  $\text{PIP}_3$  画分の濃縮、水酸基のメチル化によるイオン化効率の向上、三連四重極型質量分析計を用いた選択反応モニタリング法を確立し、高感度の測定系構築に成功した(図2)。この測定法を用いて SHIP1 欠損 MΦ および PTEN 欠損 MΦ で蓄積する  $\text{PIP}_3$  分子種を解析したところ、

SHIP1 欠損 MΦ では 38:4  $\text{PIP}_3$  が増加したのに対し、PTEN 欠損 MΦ では様々な種類の  $\text{PIP}_3$  分子種が増加することを見出した。このような違いは、薬剤誘導性に SHIP1 と PTEN を発現誘導する HEK293 細胞を用いた解析においても確認できた。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の脱リン酸化活性測定の結果、SHIP1 と PTEN では  $\text{PIP}_3$  分子種に対する

脱リン酸化活性が異なることが確認され、このことが蓄積する  $\text{PIP}_3$  分子種の違いを導くものと考えられた。これまでの報告によると、SHIP1 と PTEN の下流ではともに AKT が活性化するとされている。そこで腹腔常在細胞における AKT の活性化を調べたところ、PTEN 欠損腹腔常在細胞でのみ AKT の活性化亢進が認められた。SHIP1 欠損腹腔常在細胞では AKT は活性化しておらず、分子 X が活性化していることを見出した。阻害剤や二重変異マウスを用いた表現型回復実験から、SHIP1 の下流では分子 X が、PTEN の下流では AKT が活性化することが明らかとなった。さらにこれらの分子の  $\text{PIP}_3$  分子種への結合を解析したところ、AKT はいずれの  $\text{PIP}_3$  分子種へも同程度の結合能を示したのに対し、分子 X は 38:4  $\text{PIP}_3$  に強く結合することを見出した。以上の解析から、SHIP1 欠損 MΦ と PTEN 欠損 MΦ が異なる MΦ へ活性化する分子機構を明らかにすることができた。



## 研究テーマ C 「 $\text{PIP}_3$ 分子種による MΦ の活性化制御と慢性炎症制御」

$\text{PIP}_3$  分子種により直接 MΦ の活性化を制御できるのであろうか。この点を明らかにするため、 $\text{PIP}_3$  分子種の細胞内直接導入を試みた。Echelon 社の Shuttle  $\text{PIP}_3$  Kit に添付のキャリアータンパク質を用いて MΦ に導入したところ、 $\text{PIP}_3$  分子種が効率よく細胞内に取り込まれることが確認できた。LPS 刺激による  $\text{TNF-}\alpha$  産生にて評価したところ、SHIP1 欠損 MΦ で蓄積した  $\text{PIP}_3$  分子種導入により  $\text{TNF-}\alpha$  産生は増加し、PTEN 欠損 MΦ で蓄積した  $\text{PIP}_3$  分子種導入により  $\text{TNF-}\alpha$  産生は減少した。このことから、 $\text{PIP}_3$  分子種は直接 MΦ の活性化を制御できると考えられた。

マウス個体レベルで  $\text{PIP}_3$  分子種の変動を導くために、LPIAT1 (lysophosphatidylinositol

acyltransferase 1)を利用した。LPIAT1 はリゾホスファチジルイノシトールの sn-2 位特異的にアラキドン酸(20:4)を導入する酵素である。LPIAT1 欠損マウスは中枢神経の異常と早期致死となる(論文 1)が、LPIAT1 ヘテロ欠損マウスでは酵素活性が半減しているものの健常である。そこで LPIAT1 ヘテロ欠損マウスを使用した。SHIP1 欠損 MΦ で蓄積する 38:4 PIP<sub>3</sub> のアシル基組成は 18:0/20:4 PIP<sub>3</sub> であることを確認した。SHIP1 欠損マウスを LPIAT1 テロ欠損バックグラウンドにすると、18:0/20:4 PIP<sub>3</sub> が減少し、肺炎の軽減、延命が認められ、MΦ の表現型も回復した。以上の結果から、PIP<sub>3</sub> 分子種は慢性炎症病態を制御し得ると考えられた。

### 3. 今後の展開

本研究により、PIP<sub>3</sub> 分子種による MΦ の活性化機構の一端が明らかになった。PIP<sub>3</sub> は SHIP1 や PTEN 以外にも多数の酵素により代謝される。今後はこれらの PIP<sub>3</sub> 代謝酵素と PIP<sub>3</sub> 分子種、MΦ の活性化機構との関連を解明し、特に病気の根本原因となる PIP<sub>3</sub> 分子種と MΦ のサブポピュレーションを見出したいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本さがけ研究期間内に、高感度の PIP<sub>3</sub> 測定系の構築、MΦ の活性化を制御する PIP<sub>3</sub> 分子種の同定、その分子機構解明と至り、研究目的をほぼ達成できたと考えている。これらのデータをまとめて直ちに論文投稿する予定である。ただ一点、当初の目論見が外れて慢性炎症を惹起する MΦ の解析には至らなかった。今後種々の PIP<sub>3</sub> 代謝酵素について解析を進め、慢性炎症の根本原因となる MΦ を見出したいと考えている。

これまで一種類と考えられていた PIP<sub>3</sub> を、アシル基の観点から多種類と捉え、生理機能の違いを見出した本研究の成果は、MΦ の活性化のみならず、多岐にわたる細胞生理応答に関する重要な知見をもたらしたと考えている。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

SHIP1欠損マウスで見られた肺炎が、マクロファージ(MΦ)特異的SHIP1欠損マウスでは発症しないことから、当初期待されたSHIP1欠損型MΦが肺炎の根本原因であるという仮説は否定された。しかし、高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性についての検討では、MΦ特異的SHIP1欠損マウスの脂肪組織におけるM1MΦの増加とM2MΦの減少が認められて全身性のインスリン抵抗性が増悪し、一方MΦ特異的PTENマウスの脂肪組織ではM1MΦの減少とM2MΦの増加が認められ全身性のインスリン抵抗性が改善した。このことから、SHIP1欠損型MΦとPTEN欠損型MΦは慢性炎症病態を修飾するMΦであることを明らかにすることができた。また、PIP<sub>3</sub>分子種の測定系構築に成功して、SHIP1あるいはPTEN欠損MΦで蓄積するアシル基などの異なるPIP<sub>3</sub>分子種を同定し、それらの分子種により直接MΦの活性化状態を制御できること確認した。今後この新たな測定系を駆使し、炎症病態においてキーとなるPIP<sub>3</sub>分子種を見出すことなど、さらなる研究の発展が期待できる。

### 5. 主な研究成果リスト



(1)論文(原著論文)発表

1. Lee HC, Inoue T, **Sasaki J**, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol Biol Cell*. **23**; 4689–4700, 2011
2. Takasuga S, Horie Y, **Sasaki J**, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Chida S, Kontani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**; 1726–31, 2013
3. Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, **Sasaki J**, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat Commun* **4**; 2763–2768, 2013

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 佐々木 純子 マクロファージの活性化と慢性炎症 千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2012 年 7 月
2. Junko Sasaki. Macrophage Activation by Phosphoinositides. Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease (JST-CREST International Symposium), 東京、2013 年 2 月
3. 佐々木純子、中西広樹、高須賀俊輔、佐々木雄彦 イノシトールリン脂質によるマクロファージの活性化と寿命制御、第 86 回日本生化学会大会、神奈川、2013 年 9 月
4. 佐々木純子、中西広樹、佐々木雄彦 質量分析法によるホスホイノシタイドの解析「修飾シグナル病」第 3 回公開シンポジウム シグナル伝達解析技術と数理モデルの最先端、東京、2014 年 1 月
5. 佐々木純子、佐々木雄彦 マクロファージの活性化と慢性炎症 別冊 BIO Clinica 2 (2); 116–121 (2013)