

研究報告書

「炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 華山 力成

1. 研究のねらい

慢性炎症の発症において、マクロファージは中心的な役割を担う細胞である。例えば、動脈硬化巣に浸潤したマクロファージは変性 LDL や死細胞を貪食しリソソームで融解するが、これらが過剰にあると融解しきれず蓄積し泡沫細胞へと変化する。血管内膜に蓄積した泡沫細胞は、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインを放出して動脈硬化を悪化させるとともに、多くの蛋白分解酵素を分泌型のリソソームから放出して細胞外マトリックスや線維成分を融解しプラークの破綻を引き起こす。マクロファージなどの炎症性細胞によるリソソーム酵素の放出は他者融解 (heterolysis) と呼ばれ、周囲の細胞を壊死させ蛋白質の変性を引き起こす。その結果、更なる炎症が引き起こされ慢性炎症を惹起すると考えられる。しかしながら、この過程を制御する分子機構はこれまでほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、炎症性マクロファージの分泌型リソソームに着目し、それらがどのような分子機構によりリソソーム酵素を細胞外へ放出するかを包括的に明らかにすることを目標にしている。更にその分子機構を欠損したマウスを解析することによって、炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出が慢性炎症の発症にどのように関与するかを明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

リソソームの開口放出はリソソームと細胞膜が融合することにより制御されている。私達は、この融合過程を促進する分子として myoferlin を同定した。Myoferlin はリソソームと細胞膜上に局在する膜蛋白質で細胞質側に 6 つの C2 ドメインを持っており、カルシウムイオン依存的に両者の膜リン脂質ホスファチジルセリンと結合する。この結合により、リソソームと細胞膜の融合が引き起こされ開口放出を促進される。私たちは myoferlin 欠損マウスを作製し、実際にマクロファージによるリソソーム酵素の放出が障害されているかを検討した。培養細胞系において、カルシウム刺激による骨髓由来マクロファージからのリソソーム酵素の放出を調べたところ、欠損マウス由来のマクロファージでは野生型に比べ放出が強く障害されていた。さらに生体内での影響を調べる為、大腸菌の死菌を腹腔内に投与し誘導されてくるマクロファージが腹水中に放出するリソソーム酵素の量を比較したところ、欠損マウスで顕著に減弱していることが明らかになった。そこで、リソソーム酵素の放出を介して、myoferlin が他者融解を促進するかを検討した。大腸菌投与後の腹水を濃縮し NIH3T3 細胞の培養液に加えて 3 日後の細胞の生存率を調べたところ、90%もの細胞が死滅するが、myoferlin 欠損マウスから調整した腹水を用いた場合では、細胞がほとんど傷害されないことが明らかとなった。この結果から、myoferlin はリソソーム酵素の放出を介して、他者融解を促進する分子であることが示された。

次に、myoferlin はマクロファージが細菌などの異物を取り込んだファゴリソーム膜上にも存在する為、細胞膜との融合を介して貪食消化後の残渣の放出を促進するかを電子顕微鏡により検討した。Myoferlin 欠損マクロファージでは、残渣を抱え込んだファゴリソームが細胞膜周辺に顕著に増加しており、残渣の放出が阻害されていることが明らかとなった。その結果、多数の残渣の蓄積により myoferlin 欠損マクロファージでは刺激が強かつ長期間入る為、IL-6 や IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現誘導が顕著に増強されることが明らかとなった。このことは、マクロファージが細菌を貪食した後に残渣が適切に放出されることが炎症の収束に重要な過程であることを示している。

(2) 詳細

研究テーマ A 「Myoferlin によるリソソームの融合機構」

活性化したマクロファージは様々な状況で、リソソーム酵素を放出することが知られている。例えば、動脈硬化巣で活性化マクロファージはリソソーム酵素を放出してコラーゲン線維を分解することにより、血管の脆弱性を引き起こす。また、活性化マクロファージはリソソーム酵素を放出してエラスチン線維を分解することにより動脈瘤を引き起こす。このように、マクロファージによるリソソーム酵素の放出は、組織の破壊を通して様々な病気の原因になると考えられている。最近私達は、マクロファージによるリソソーム酵素の放出を制御する分子として myoferlin という分子を同定した。Myoferlin は細胞質側に 6 つの C2 ドメインを持つ膜蛋白質で、カルシウム依存的にホスファチジルセリンと結合する。私達は myoferlin が細胞膜とリソソーム膜に局在しており、カルシウム刺激で両者の膜リン脂質ホスファチジルセリンと互いに結合することによって、リソソームと細胞膜の融合を促進することを見出した。その結果、リソソーム酵素が放出され、周囲の組織・細胞に傷害を引き起こすと考えられる(図1)。

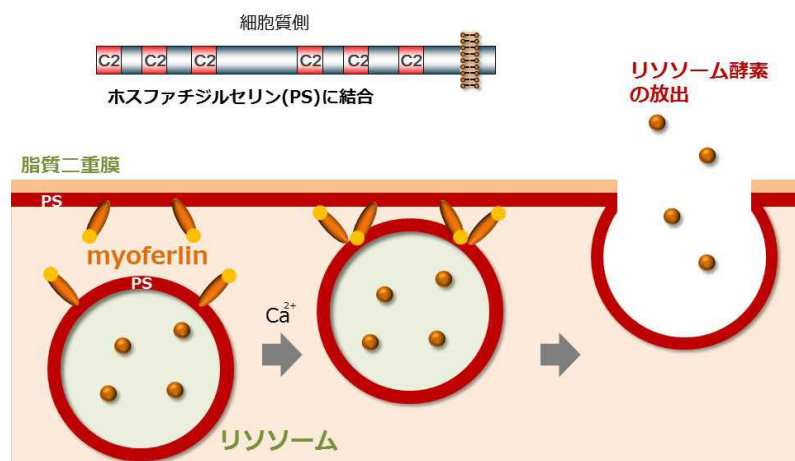


図1. Myoferlin によるリソソームの開口放出機構

私達はまず myoferlin の機能を調べるため、shRNA を用いて myoferlin をノックダウンした NIH3T3 細胞を作製した。これらの細胞を LAMP1 で染色したところ、myoferlin ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、リソソームの量が明らかに多いことが判明した。更にこれらの細胞を Lysotracker で染色してリソソームの量を FACS で定量化したところ、myoferlin ノ

ックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、平均値で3倍程リソソームの量が多い事が明らかとなった。これらの結果は、myoferlin を減少させるとリソソームが蓄積することを示している。次にこれらの細胞を電子顕微鏡で観察した。myoferlin ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、多くのリソソーム小胞の中に残渣と思われる構造物や、何か膜のような構造物が蓄積していることが明らかとなった。この結果は、myoferlin の減少によりリソソームの開口放出が阻害され、その結果、リソソーム内に残渣が蓄積した為と考えられる。そこで、myoferlin が実際にリソソーム酵素の放出を促進するかを検討する為、リソソーム酵素の一つである β -hexosaminidase の放出を定量化した。まず、骨髓由来マクロファージに myoferlin に対する shRNA を導入した。これらのマクロファージにカルシウム透過促進剤である A23187 を作用させ、上清を回収し蛍光基質と反応させて放出された酵素量を定量化した。すると myoferlin をノックダウンした細胞では、コントロールに比べ、放出される β -hexosaminidase の量が有意に減少していることが明らかとなった。次に同様のことが生体内でも起きているかを検討する為、myoferlin KO マウスを作製し、マウスの腹腔内に大腸菌を投与して腹腔内のマクロファージが腹水中に放出したリソソーム酵素の量を定量してみた。すると、野生型マウスでは、大腸菌の投与後、強く増加するのに対し、myoferlin KO マウスではリソソーム酵素の放出が障害されていることが明らかとなった。そこで腹水による細胞傷害性を調べる為、大腸菌投与後の腹水を濃縮し NIH3T3 細胞の培養液に加えた。その後、NIH3T3 細胞の生存率を調べたところ、野生型マウスの腹水ではほとんどの細胞が死滅するが、myoferlin KO マウスの腹水では、殺す活性が顕著に減弱しているのが分かった。このことから、myoferlin はリソソーム酵素の放出を介して、細胞傷害を促進する分子であると考えられる。実際、マウスの腹腔内に大腸菌を大量に投与してみたところ、野生型のマウスでは3日以内にほぼ全てのマウスが死滅するが、myoferlin KO マウスはかなりの抵抗性をもつことが分かった。この結果は、リソソーム酵素の放出が過剰になると、組織傷害によって個体の生存率が低下することを示している。

研究テーマB「リソソームの開口放出による慢性炎症の発症機構」

Myoferlin はマクロファージが細菌や死細胞などの異物を取り込んだファゴリソソーム膜上にも存在する為、細胞膜との融合を介して貪食後の残渣の放出を促進するかを電子顕微鏡により検討した。Myoferlin 欠損マクロファージでは、残渣を抱え込んだリソソームが細胞膜周辺に顕著に増加しており、残渣の放出が阻害されていることが明らかとなった。同様に、蛍光色素で標識した大腸菌の死菌をマクロファージに貪食させ、残渣が蓄積したままマクロファージが発色し続けるのか、もしくは残渣の放出によりマクロファージが無色に戻るのかを FACS を用いて定量化したところ、myoferlin 欠損マクロファージでは、貪食後8時間以降、顕著に残渣が蓄積していることが明らかとなった。その結果、残渣の蓄積により myoferlin 欠損マクロファージでは刺激が強かつ長期間入る為、IL-6 や IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現誘導が顕著に増強されることが分かった。このことは、残渣が適切に放出されることが炎症の収束に重要な過程であることを示していると考えられる(図2)。



図2. Myoferlin 欠損による残渣の蓄積と慢性炎症応答の発症機序

研究テーマ C 「リソソームの開口放出に関わる分子群の包括的同定」

リソソーム酵素の放出には、(1) 分泌型リソソームの発達 (2) 細胞膜への輸送 (3) 細胞膜との融合などの過程が必須であるが、これらの過程を制御する分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで私たちは、shRNA ライブラリーを用いて、myoferlin 以外にもリソソームの開口放出に関与する分子の探索を行った。分泌型リソソームの発達過程が障害されると、Lysotracker で陽性になるリソソームの数が減少する。逆に、分泌型リソソームの細胞膜への輸送と細胞膜との融合が阻害されると、Lysotracker 陽性のリソソームの数が増加する。このように、Lysotracker 陽性のリソソーム数を指標として、その数に異常をきたす細胞をスクリーニングし、その原因となる遺伝子の同定を試みたところ、myosin Va と TRPML1 が同定された。Myosin Va はこれまでに、細胞内小胞の輸送と放出に関与することが報告されている。一方、TRPML1 は、リソソームに局在しているカルシウムチャネルであり、貪食消化された異物から漏出したカルシウムを細胞質に透過させる。このカルシウム刺激が、myoferlin によるリソソーム酵素の開口放出を促進すると考えられる。

3. 今後の展開

マクロファージによる他者融解は重篤な感染症において生死を決める重要な要因であり、myoferlin の機能を阻害する薬剤を開発し他者融解を抑制することにより、感染症時における生存率を上げることが期待される。またマクロファージによるリソソーム酵素の放出が、心血管炎症の引き金になっている可能性があり、myoferlin の機能を阻害することにより、動脈硬化や虚血再灌流傷害、動脈瘤など様々な心血管炎症疾患の治療法の開発が期待される。更に今後、MRI などの画像診断を用いて他者融解による組織傷害を可視化する技術の開発が可能になるであろう。また、マクロファージによるリソソームの開口放出機構は、その他にも様々な免疫応答に関与していると考えられる。例えば、MHC による抗原提示はファゴリソソームと細胞膜との膜融合によって制御されている。今後は myoferlin がこれらの膜融合過程を制御するのかを明らかにする必要がある

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

1)本研究では、マクロファージによるリソソーム開口放出を担う主要分子として myoferlin を同定することに成功した。また、この分子の欠損によりマクロファージによる細菌貪食後の炎症応答が顕著に増強・延長することで慢性炎症応答が引き起こされることを見出した。更に、この分子を介したリソソーム酵素の放出が過剰になると健常組織の傷害を誘発することも明らかにした。これらの結果により、当初予定していた研究目的をほぼ達成することができた。また、予定通りの研究実施体制を整え、研究費の執行も過不足なく効率良く行うことができた。

2)本研究では、リソソームの開口放出機構が異常になることにより、慢性炎症を引き起こすことを明らかにした。今後本研究の成果により、myoferlin を標的にした慢性炎症の治療法を開発することが期待される。Myoferlin 阻害薬を用いることにより、将来、動脈硬化などの慢性炎症性疾患や、虚血後の再灌流傷害を制御することが可能となり、現在多くの日本人が罹患している虚血性心疾患や脳梗塞の治療に大きなインパクトを与えることができると期待している。

3)リソソームの開口放出は、アポトーシス、オートファジーに続く第三のリソソームによる生体恒常性維持機構である可能性を持つと考えている。本研究を基礎として、これまで細胞内消化の中心として研究されてきたリソソームが、実際には細胞外での融解によって様々な生理現象や病理病態に関与する事が示すことが可能となり、今後新たなパラダイムシフトをもたらしうると期待している。

(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)。

(研究総括)

本課題では、慢性炎症の病態におけるマクロファージの役割を、リソソームの開口放出という観点から明らかにした。まず、リソソームと細胞膜の融合を促進する分子として myoferlin を同定し、myoferlin 欠損マクロファージにおいてリソソームやファゴリソソームの開口放出が阻害されていることを明らかにした。その結果、myoferlin 欠損マクロファージでは、細菌を貪食し消化した後に発生する残渣の開口放出が障害されており、蓄積した残渣がファゴリソソーム内で刺激を入れ続けることによって、IL-6 や IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現誘導が長期間増強されることを見いだした。この結果から、マクロファージが細菌を貪食した後にその残渣を適切に放出することが炎症の収束に必須であるという新たな概念を提案した。一方、重度の細菌感染の結果、マクロファージによるリソソームの開口放出が過剰になると、多量のリソソーム酵素が放出され、周囲の健常な細胞や組織の傷害を引き起こすことを見いだした。さらに、myoferlin 以外のリソソームの開口放出に関わる他の分子として、細胞内小胞の輸送と放出に関与する Myosin Va やリソソームに局在するカルシウムチャネル TRPML1 を見いだした。

以上のように、炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出が周囲の細胞に対応して傷害性を有すること、その開口放出が myoferlin によって制御されていることなどを明らかにした。今後、開口放出に関与する分子の制御機構を明らかにし、慢性炎症性疾患の予防や治療効果に関する研究展開に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Song J & Hanayama R. Myoferlin-mediated lysosomal exocytosis regulates cytokine response and cytotoxicity by phagocytes.
(改訂論文審査中) |
| 2. Bahrini I, Song J, Diez D, Hanayama R. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia.
Sci Rep. (2015) 5, 7989 |

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 華山 力成
発明の名称: 分泌膜小胞エクソソームの精製法
出 願 人: 大阪大学
出 願 日: 2014/12/6
出 願 番 号: 特願 2014-246876

(2)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. 大阪大学総長顕彰 (2014)
2. アステラス病態代謝研究会・最優秀理事長賞 (2012)

[招待講演]

1. Hanayama R.
Identification of a novel regulator for lysosomal fusion in macrophages.
日本-スウェーデン研究交流会, ワークショップ, 東京 2012 年 11 月 29 日
2. Hanayama R.
Identification of a novel regulator for lysosomal fusion in macrophages.
第 2 回 御茶ノ水動脈硬化国際フォーラム, シンポジウム, 東京 2013 年 2 月 23 日
3. Hanayama R.
Phosphatidylserine-dependent phagocytosis, digestion and exocytosis by macrophages.
第 86 回 日本生化学会大会, シンポジウム, 横浜 2013 年 9 月 12 日
4. 華山 力成
ホスファチジルセリンを介したマクロファージの貪食・消化・放出機構
第 10 回 宮崎サイエンスキャンプ, シンポジウム, 宮崎 2014 年 2 月 14 日
5. 華山 力成
マクロファージによる自己血球貪食と他者融解の分子機構
Research PlaNet 2014, シンポジウム, 東京 2014 年 5 月 10 日
6. Hanayama R.
Phosphatidylserine-dependent lysosomal fusion in macrophages.
第 87 回 日本生化学会大会, シンポジウム, 京都 2014 年 10 月 17 日

7. Hanayama R.
Mechanisms of hemophagocytosis and heterolysis by macrophages.
France-Japan Immunology meeting, シンポジウム, カシス(フランス) 2014 年 10 月 23 日
8. Hanayama R.
Efferocytosis, hemophagocytosis and heterolysis by macrophages.
台北医学大学, 特別講演, 台北(台湾) 2015 年 3 月 26 日
9. 華山 力成
血球貪食症候群と他者融解の分子機構
第 26 回 日本生体防御学会学術総会, シンポジウム, 東京 2015 年 7 月 11 日
10. 華山 力成
貪食細胞による自己炎症疾患の発症機序
第 15 回 Hypertension Conference, 特別講演, 大阪 2015 年 7 月 25 日
11. 華山 力成
血球貪食症候群と他者融解の分子機構
第 2 回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス, 次世代リーダーセッション, 東京 2015 年 10 月 3 日