

【トピックス】 <第34回日本基礎老化学会大会奨励賞受賞>

マクロファージからのサイトカイン分泌に関与する低分子量Gタンパク質 Rabファミリーの機能解析

森 亮一⁽¹⁾、間所 俊介⁽¹⁾、Kim Sang Eun⁽¹⁾、小松 利光⁽¹⁾、千葉 卓哉⁽¹⁾、坪井 貴司⁽²⁾、下川 功⁽¹⁾

⁽¹⁾ 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 探索病理学

⁽²⁾ 東京大学 大学院総合文化研究科 生命環境科学系

1. はじめに

皮膚創傷治癒過程は、炎症細胞浸潤を主体とした炎症期、再上皮化・肉芽形成・血管新生が行われる増殖期、最後に、過剰に生産された細胞外基質が分解される成熟期から構成される生体防御反応である。これら一連の過程は、細胞表面やサイトカインを介した細胞間相互作用で制御されている。通常、創傷治癒後に瘢痕（線維化）が残るが、胎生期の皮膚創傷修復部位では、瘢痕が形成されず、皮膚組織が完全に再生することが知られている。この際、創傷部位に炎症細胞の集簇が観察されないことから、炎症細胞が瘢痕形成に深く関与していると示唆されているが、瘢痕形成の分子メカニズムについては、未だ解明されていない [1, 2]。

創傷部におけるマクロファージ等の炎症細胞は、主要な炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF α) を分泌する。皮膚創傷治癒過程における TNF α の役割については、様々な報告がなされている。リコンビナント TNF α タンパク質等を用いて創傷部局所的に投与すると、治癒に対して促進的または遅延的に働き、相反する様態を示す [3-6]。また、TNF α 受容体である TNF-Rp55 欠損 (KO) マウスは、炎症の減弱に伴って治癒が促進する [7]。従って、TNF α を標的とした治療を行う場合、TNF α 発現を厳密に調節することが必須である。

転写誘導された TNF α mRNA は、小胞体において TNF α タンパク質に合成される。その後、ゴルジ体で分泌顆粒内に貯蔵され、細胞膜近傍へと運搬されて、細胞外へ分泌される。その分泌顆粒を輸送する分子として中心的な役割を担っているのは、低分子量 G タンパク質 Rab ファミリーである。現在までに Rab ファミリーは、ほ乳類において約 60 種類存在することが

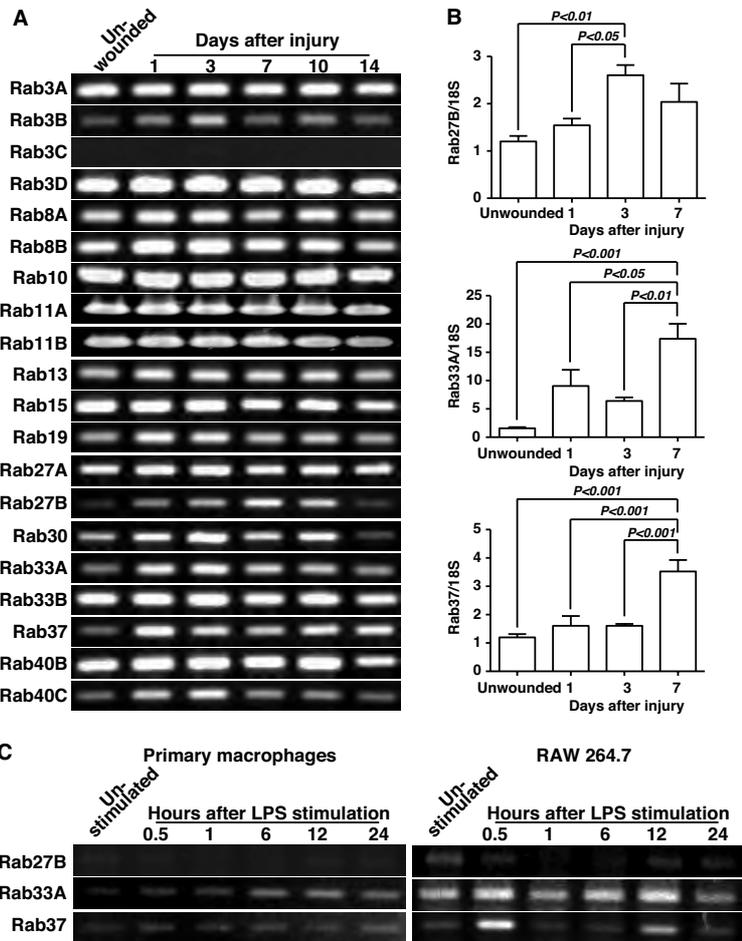


図1 皮膚創傷治癒過程におけるRabファミリーの遺伝子発現動態 (A) RT-PCR法を用いたRabファミリー遺伝子発現動態。(B) qPCR法を用いたRab27B、Rab33A、Rab37遺伝子発現動態。(C) LPS刺激による初代培養マクロファージ及びマクロファージRAW264.7細胞株における遺伝子発現動態。(Eur. J. Immunol. 2011, in pressより引用)

報告されている [8]。最近の報告では、エンドソームに関与している Rab11 は、マクロファージにおけるサイトカイン分泌に関与していることが示唆されている [9]。しかしながら、その他のRabファミリーのサイトカイン分泌における機能については、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、マクロファージにおける炎症反応特異的 Rabファミリーの同定及び機能解析を行った。

2. マウス皮膚創傷治癒過程におけるRabファミリーの遺伝子発現解析

炎症反応に依存して発現誘導されるRabファミリーの同定を目的として、マウス皮膚創傷治癒モデルを用いて

〒852-8523
長崎市坂本1丁目12-4
TEL: 095-819-7051
FAX: 095-819-7052
E-mail: ryoichi@nagasaki-u.ac.jp

解析を試みた。RT-PCR法を用いて1次スクリーニングを行った結果、6種類のRab (Rab3B、Rab27B、Rab30、Rab33A、Rab37、Rab40C) が炎症期及び増殖期において、顕著に発現誘導されていた (図1A)。次に、定量PCR法 (qPCR) を用いてこれら6種類のRabの発現パターンについて詳細な解析を試みたところ、Rab27B、Rab33A、Rab37の3種類のRabが、増殖期において有意に増加していた (図1B)。

マクロファージは、皮膚創傷治癒過程の炎症後期から増殖期にかけて創傷部位に集積する [10]。従って、上記3種類のRabが、マクロファージにおいて発現していると示唆される。そこで初代培養マクロファージ及びマウスマクロファージ

RAW264.7細胞株を用いて、lipopolysaccharide (LPS) 刺激によるこれら3種類のRabの発現動態を解析した。その結果、Rab37のみが、両細胞においてLPSに伴って発現上昇していた (図1C)。また、in situ hybridization法及び免疫組織化学的手法を用いてRab37発現細胞の同定を行ったところ、創傷部に集積しているマクロファージは、Rab37を発現していた (data not shown)。以上の結果から、Rab37は、マクロファージからのサイトカイン分泌に関与していると示唆された。

3. Rab37はマクロファージからのTNF α 分泌に必須である

創傷部に集積しているマクロファージは、様々なサイトカイン、ケモカイン、増殖因子を分泌している。そこで、RAW264.7細胞株を用いて、LPS刺激によるTNF α mRNAの発現動態を解析した。その結果、LPS刺激後、20分で速やかに発現誘導されることが確認された (図2A)。次にRab37の機能解析を行うため、野生型 (WT)、活性型 (Rab37QL)、不活性型 (Rab37TN) のRab37過剰発現ベクターを構築し、RAW264.7細胞に遺伝子導入を行い、LPS刺激時のTNF α mRNAの発現動態を解析した (図2B)。その結果、各細胞群において、TNF α mRNAが正常に発現誘導されていた。遺伝子導入を行った際、細胞本来の生理機能を阻害する可能性がある。本結果は、各種のRab37変異体を過剰発現させても、RAW264.7細胞株は、生理機能を失うことなく、LPS刺激によりTNF α の遺伝子発現解析を行えることを示している。

次に、siRNAを用いて内因性Rab37発現抑制 (KD)

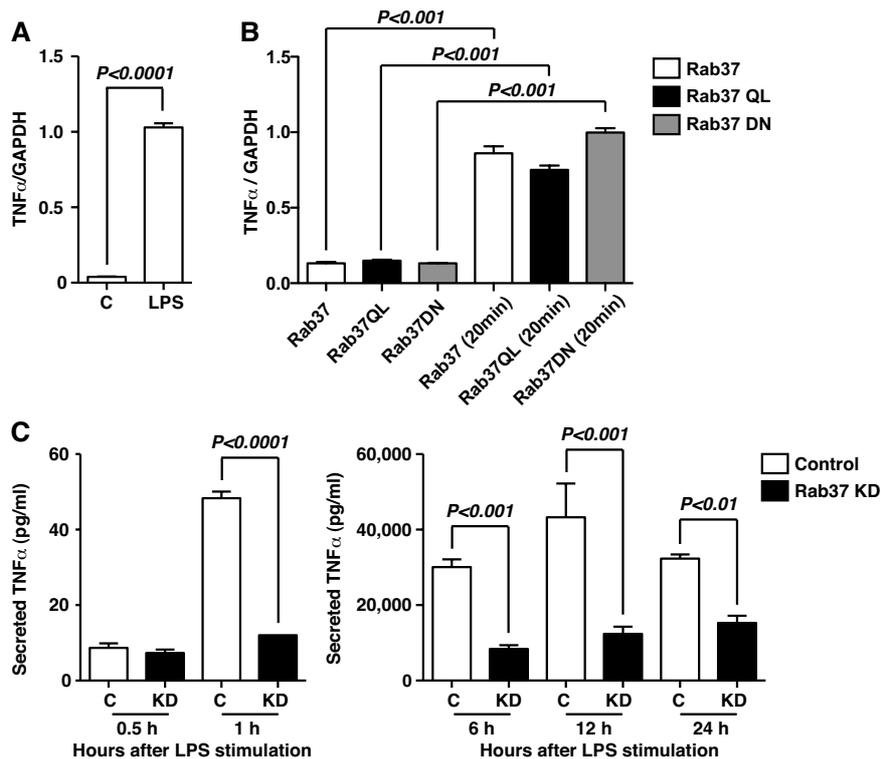


図2 Rab37はTNF α 分泌に必須である

(A) qPCR法によるTNF α の遺伝子発現。(B) Rab37、Rab37QL、Rab37DN過剰発現RAW264.7細胞株におけるTNF α 遺伝子発現動態。(C) Rab37KDマクロファージではTNF α 分泌が減少する。(Eur. J. Immunol. 2011, in pressより引用)

を行い、LPS刺激によって起こるTNF α 分泌を、ELISA法を用いて解析した。その結果、TNF α 分泌は、Rab37KD群において有意に減少していた (図2C)。以上の結果から、Rab37はマクロファージからのTNF α 分泌に必須である事が明らかとなった。

4. 生細胞ライブイメージングを用いたRab37の動態解析

全反射照明蛍光顕微鏡法(TIRF)は、生細胞の細胞膜表面近傍に存在する蛍光分子を特異的に可視化解析できる技術である。そこで、LPS刺激によって活性化させたマクロファージにおけるRab37の動態を、TIRFを用いて解析した。その結果、Rab37はLPS刺激後、速やかに細胞膜近傍へ移動したことから、TNF α 分泌に関与することが示唆された (図3A)。

次にRab37及びTNF α の細胞内局在を、細胞免疫染色 (ICC) 及び免疫電子顕微鏡法を用いて解析した。その結果、Rab37はTNF α と共局在していることが確認された (図3B及び3C)。

5. Rab37結合タンパク質の同定

Rabファミリーは、Rabに特異的に結合するタンパク質 (エフェクタータンパク質) と相互作用して膜 (小胞) 輸送を制御する。そこで包括的プロテオーム解析を行い、網羅的にRab37の結合タンパク質の同定を試みた。その結果、29種類の膜 (小胞) 輸送に関連するRab37結合タンパク質を同定した。その中でも分泌制御タンパク質

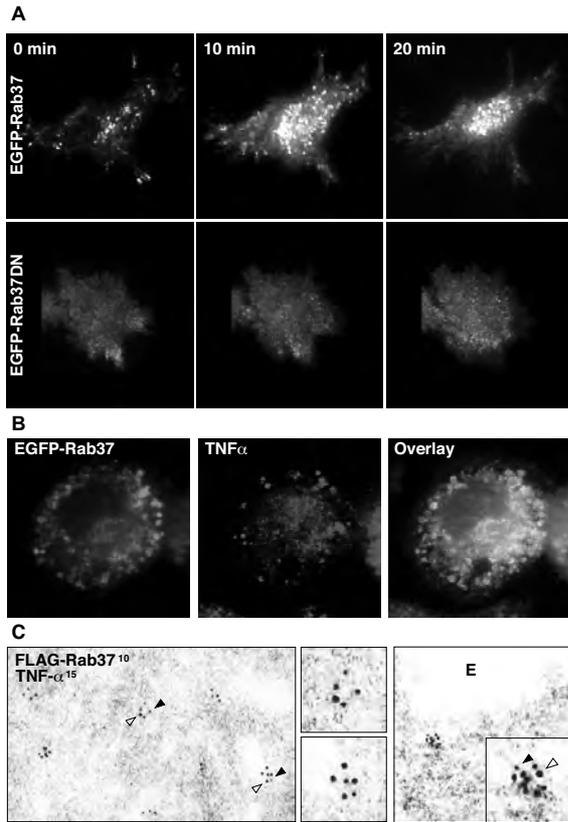


図3 マクロファージにおけるRab37及びTNF α の細胞内局在解析

(A) TIRFによるRab37動態解析。LPS刺激後、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-Rab37は細胞膜近傍へ移動する。一方、EGFP-Rab37DNは移動しない。(B) ICC法を用いたRAW264.7細胞株におけるLPS刺激後のRab37及びTNF α の局在。(C) 免疫電子顕微鏡解析によるRab37及びTNF α の局在。FLAG-Rab37 (黒色矢頭: 10 nm gold)、TNF α (白色矢頭: 15nm gold)。E: 細胞外。(Eur. J. Immunol. 2011, in pressより引用)

Munc13-1に着目して解析を行った。まずMunc13-1、Rab37及びTNF α のマクロファージ内での局在を調べたところ、Munc13-1は Rab37及びTNF α と共局在していた (図4A、4B)。さらに、Munc13-1KD RAW264.7細胞では、Rab37KD RAW264.7細胞と同様にTNF α の分泌抑制効果が認められた (図4C)。

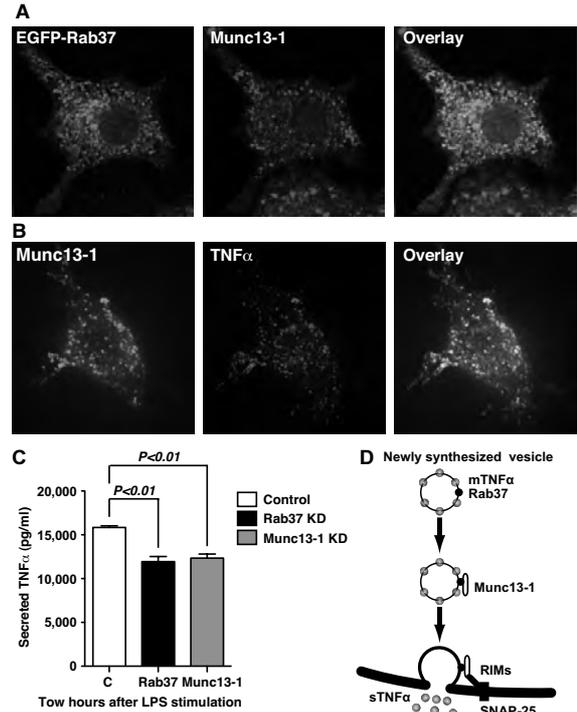


図4 Rab37/Munc13-1複合体はTNF α 分泌に必須である

(A 及び B) Munc13-1、Rab37、TNF α の局在。(C) siRNA法を用いたMunc13-1及びRab37のTNF α 分泌解析 (D) マクロファージにおけるRab37によるTNF α 分泌のモデル。炎症刺激を受けたマクロファージでは、速やかにTNF α mRNAが合成され、小胞体、ゴルジ体を経由して膜結合型TNF α タンパク質 (mTNF α) が生産される。その後、mTNF α を含んだ分泌小胞上にRab37が局在し、細胞膜近傍まで輸送される。分泌小胞上のRab37は、Munc13-1と結合すると考えられる。神経細胞における先行研究から、Munc13-1は、他の分泌関連タンパク質 (Rab3A-interacting molecules (RIMs)、synaptosome-associated protein-25 kDa (SNAP-25)) と結合すると考えられている [11]。そこで、マクロファージにおいてもMunc13-1がこれら他の分泌関連タンパク質と結合することで、分泌準備態勢に移行するのではないかと考えている。そして最終的にmTNF α は、TNF α 変換酵素によって切断をうけて可溶性TNF α (sTNF α) として細胞外へ分泌されると考えられる。(Eur. J. Immunol. 2011, in pressより引用)

以上の結果から、Rab37は Munc13-1と相互作用してTNF α 分泌に関与することが示唆された (図4D)。

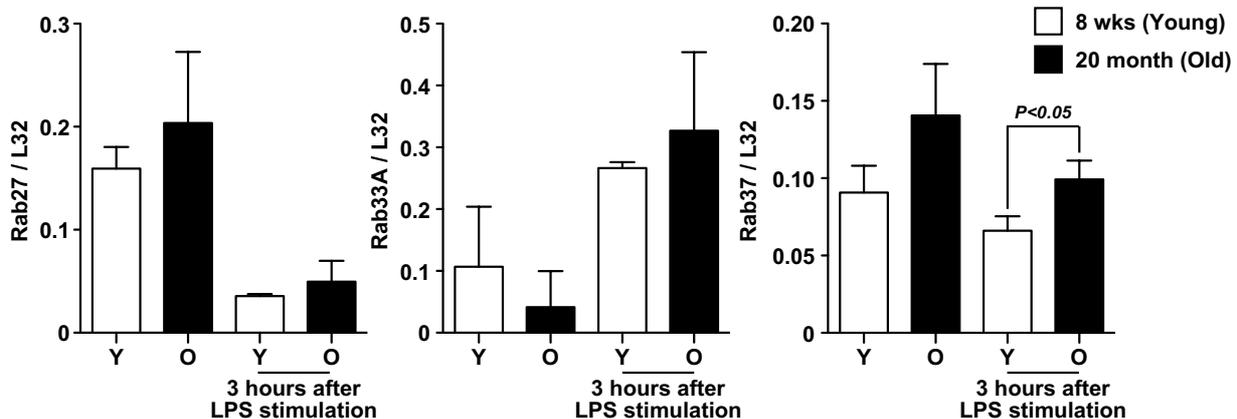


図5 qPCR法を用いた、老化マウスから採取した初代培養マクロファージにおける炎症関連Rab遺伝子の発現解析

6. 老化細胞におけるRab37の機能

老化細胞では、サイトカイン分泌能の変化が起こることが知られている。例えば、炎症性サイトカインを本来分泌しない上皮系細胞が、老化に伴って炎症性サイトカインを分泌する。また炎症細胞では、サイトカイン分泌レベルの上昇が明らかとなっている。これまで、転写因子や遺伝子発現に着目した研究が行われてきたが、実際に産生されたサイトカインの輸送や分泌に着目した解析は、行われていない。従って、老化細胞におけるサイトカイン分泌の変化は、遺伝子発現の変化と相まって、Rabファミリーの発現・機能亢進も関係していると考えられるが、未だ明らかではない。そこで老化マウスから初代培養マクロファージを採取し、Rabの発現動態解析を行った。その結果、炎症に関連すると推察されるRabの中でも、Rab37のみが老化マウスから採取した初代培養マクロファージにおいて発現亢進していた(図5)。この結果は、老化に伴う炎症性サイトカイン分泌の亢進においても、Rab37が関与していることを示唆する結果であり、非常に興味深い。

7. おわりに

本研究により、これまで未解明だったRab37を中心としたTNF α 分泌機構の分子メカニズムの一端が明らかとなった。今後は、Rab37KOマウスの作成、RAW264.7細胞株を用いた細胞老化モデルの確立等を試み、*in vivo*及び*in vitro*の両側面からRab37の老化における機能解析に取り組みたいと考えている。

参考文献

1. Stramer BM, Mori R and Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 127:1009-1017, 2007.
2. Shaw TJ, Kishi K and Mori R. Wound-associated skin fibrosis: mechanisms and treatments

based on modulating the inflammatory response. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 10:320-330, 2010.

3. Rapala K, Laato M, Niinikoski J et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. *Eur Surg Res* 23:261-268, 1991.
4. Mooney DP, O'Reilly M and Gamelli RL. Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg* 211:124-129, 1990.
5. Salomon GD, Kasid A, Cromack DT et al. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg.* 214:175-180, 1991.
6. Buck M, Houghlum K and Chojkier M, Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol* 149:195-204, 1996.
7. Mori R, Kondo T, Ohshima T et al. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J* 16:963-974, 2002.
8. Gurkan C, Lapp H, Alory C et al. Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. *Mol Biol Cell* 16:3847-3864, 2005.
9. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG et al. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 310:1492-1495, 2005.
10. Mori R, Shaw TJ and Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med* 205:43-51, 2008.
11. Martin T.F.J. Prime movers of synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* 34: 9-12, 2002.