

アンギオポエチン様蛋白質による免疫細胞活性制御

琉球大学大学院 医学研究科
海川 正人

1. はじめに

近年、運動不足や肥満により生体内で慢性炎症が誘導され、慢性炎症がインスリン抵抗性や2型糖尿病などの糖代謝異常、脳卒中や狭心症・心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の病態に深く関係している事が明らかになっている。また、慢性炎症が神経変性疾患、癌の発症・浸潤・転移などさまざまな疾患の病態にも関わっていることも明らかになってきており、炎症に関わる免疫細胞群の機能的な特徴と炎症部位の細胞相互の関わりを分子レベルで解明する事が病態を理解する上で重要である。

アンギオポエチン様蛋白質 (Angiopoietin-like protein (Angptl) ファミリー) は Angptl1 ~ Angptl7 の 7 種類の蛋白質から構成され、血管新生促進因子アンギオポエチン (angiopoietin) と高いアミノ酸配列相同性を示す分泌蛋白質群である。血管新生制御、脂質代謝やエネルギー代謝など幅広い生理作用を示す他、造血幹細胞の増殖因子としても働くことが明らかとなっている。Angptl 蛋白質のうち Angptl2 は肥満の内臓脂肪組織で発現し、脂肪組織での炎症の発症、維持に関係していることや、Angptl2 KO マウスの解析から、腫瘍血管新生などの病的血管新生において重要な働きをしていると考えられており、慢性炎症との関わりが深い。また、Angptl2 は、血管内皮細胞に作用するほか、*in vitro* で分化させたマクロファージ細胞株の遊走能を亢進することなどが報告されており、免疫担当細胞へ直接作用する可能性が示唆されている。

これまで、Angptl 蛋白質がどのような機構で標的細胞への生理作用を発揮するか、またどのような作用を及ぼすかについては、ほとんど明らかになっていなかったが、最近、造血幹細胞における Angptl2 の受容体が免疫グロブリン様受容体 LILRB2 であることが明らかになった。LILRB2 は免疫系の細胞に広く発現がみられる Leukocyte Immunoglobulin (Ig)-Like Receptor (LILR) ファミリーに属する膜蛋白質である。LILR ファミリー受容体は、細胞外領域に複数の Ig 様ドメインを持ち、細胞内領域の構造から活性型、抑制型、分泌型の3種類より構成される。LILRB2 は細胞内領域に SHP1 などのフォスファターゼを動員する ITIM ドメインを持つ抑制型の受容体であることから、LILRB2 は Angptl2 刺激により、造血幹細胞の分化を抑制することで幹細胞性を維持しながら増殖を促進していると考えられる。また、LILRB2 はマクロファージ、樹状細胞、B 細胞など、広く免疫担当細胞に発現しており、免疫細胞の機能調節に関わっている可能性が高い。

そこで、本研究では、Angptls によって調節される新たな免疫の制御システムを明らかにする事を目的に、Angptl2 が LILRB2 などの免疫グロブリン様受容体を介して、マクロファージの分化、活性化にどのような作用を与えるか解析する。

2. 方法

① Angptl2 蛋白質の調製

大量に安価に生理活性を持った Angptl2 を調製するため、Angptl2-Flag 遺伝子をコードするレトロウイルスを作成し、293T 培養細胞に感染させ、蛋白質安定発現株を作製、クローン化した。培養液中に分泌されてくる修飾型の Angptl2-flag 蛋白質を抗 Flag 抗体 Agarose Beads を用いて精製した。

② Angptl2 の骨髄由来マクロファージに対する働き

マウス骨髄細胞を GM-CSF もしくは M-CSF 存在下で 7 日間培養すると、それぞれ M1、M2 様マクロファージ細胞 (骨髄由来マクロファージ (Bone marrow derived macrophage : BMDM)) に分化する。分化した BMDM は LPS 刺激により、TNF α や IL-6 などの各種サイトカインを産生する。そのサイトカイン産生に Angptl2 がどのような影響を与えるか解析する。

③ Angptl2 の骨髄由来マクロファージの分化に与える影響

マウス骨髄細胞を GM-CSF もしくは M-CSF 存在下で 7 日間培養すると、それぞれ M1、M2 様マ

クロファージ細胞に分化する。GM-CSF もしくは M-CSF 存在下に Angpt12 蛋白質を加え、7 日間培養し、M1 マクロファージのマーカーとして TNF α と IL-6 の産生と NOS2 遺伝子の発現を、M2 マクロファージのマーカーとして IL-10 の産生と Argnase-1、YM-1 遺伝子の発現を ELISA 法およびリアルタイム PCR 法を用いて解析した。また、それ以外の Angpt12 の作用を網羅的に解析するため、マウス骨髄細胞を GM-CSF もしくは M-CSF に加えて、Angpt12 (0.5 ug/ml) 存在下で 7 日間培養後した後、Total RNA を回収し、東レの 3D-Gene システムを用いてマイクロアレイ解析を行い、Angpt12 が BMDM の分化にどのような影響を与えるか、発現の変化する遺伝子を検索した。

3. 結果 研究成果

① Angpt12 蛋白質の調製

Angpt12 の C 末端に Flag 配列を持つ遺伝子をクローニングし、さらに 3' 側に IRES 配列とそれに続く EGFP 配列を付加した配列を pQCXIP プラスミドに組み込んだレトロウイルスベクターを作出した。作出したベクターを VSVG を含むウイルス産生用プラスミドと共に 293T 細胞にトランスフェクションしウイルスを産生させ、回収したウイルスをふたたび 293T 細胞に感染させた。Angpt12 遺伝子が組み込まれた細胞を GFP の発現を指標に限界希釈法により 48 クロウンを確立し、そのうち Angpt12-Flag 蛋白質を培地中に最も多く分泌する細胞株を選抜した(クロウン18)。選抜した細胞株を培養し、培養上清に分泌された Angpt12-Flag 蛋白質を抗 Flag 抗体 Agarose Beads を用いて精製したところ、30 ~ 60 ng/ul の Angpt12-flag 蛋白質を得た。得られた Angpt12-Flag は293T 細胞に発現させた LILRB2 と特異的に結合する事を確認し、以後の実験に用いた。

② Angpt12 の骨髄由来マクロファージに対する働き

マウス骨髄細胞を GM-CSF (20ng/ml) で分化させた M1 様マクロファージを Angpt12-Flag (0.5 ug/ml) と共に LPS (0.1 ug/ml) で刺激したところ、Angpt12 の添加は、TNF α 、IL-6 の産生には影響を与えなかった(図 A)。また同様に、M-CSF (20ng/ml) で分化させた M2 様マクロファージの LPS 刺激による TNF α 、IL-6、IL-10 の産生にも影響は見られなかった。

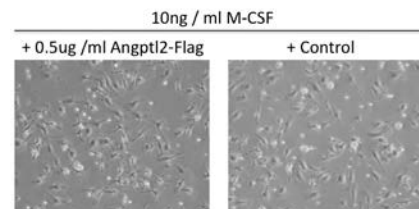
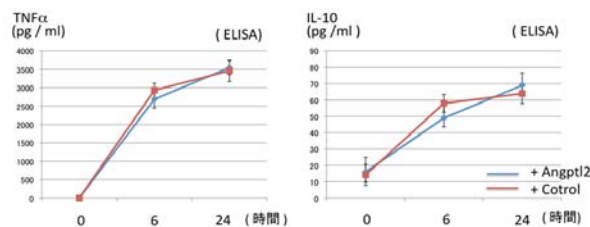
③ Angpt12 の骨髄由来マクロファージの分化に与える影響

M-CSF (20ng/ml) および GM-CSF (20ng/ml) によるマウス骨髄由来マクロファージ細胞の分化誘導において、Angpt12-Flag (0.5 ug/ml) を添加しても、形態的にはほとんど差が見られなかった。しかし、GM-CSF による分化誘導を行なった場合、形態的にはほとんど差が見られなかったが、分化してくる細胞数が僅かではあるが、多い傾向にあった(図 B)。

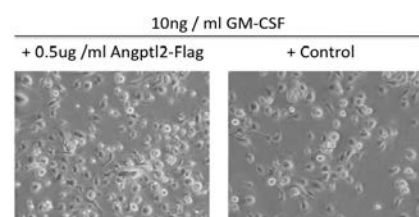
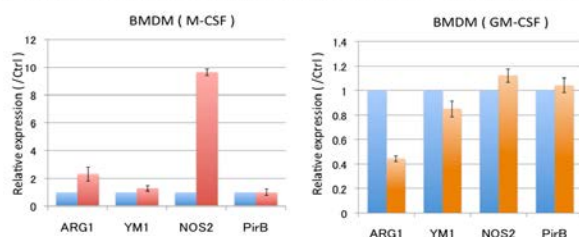
また、Angpt12 存在下で分化した骨髄由来マクロファージは、M-CSF、GM-CSF いずれで分化誘導した場合も、LPS 刺激による TNF α 、IL-6、IL-10 の産生能に違いは見られなかった。

さらに、リアルタイム PCR 法で遺伝子発現を比較したところ、M-CSF により分化誘導した細胞で M2 マーカー遺伝子 ARG1 の発現量は約 2 倍に増えていたが、M1 マーカー遺伝子の NOS2 の発現も約 9 倍に増えていた。GM-CSF により分化誘導した細胞では M2 マーカー遺伝子 ARG1、YM1 の発現量はそれぞれ約 40%、80% に有意に抑制されていたが、M1 マーカー遺伝子の NOS2 の発現量に違いはなかった(図 C)。

(A) CM-CSF により分化した骨髄由来マクロファージの LPS 刺激によるサイトカイン産生 (B) M-CSF、GM-CSF により分化させた骨髄由来マクロファージ



(C) M-CSF、GM-CSF により分化させた骨髄由来マクロファージのマーカー遺伝子の発現



次に、M-CSF に加えて Angpt12 存在下で分化誘導を行なった骨髄由来マクロファージのマイクロアレイ解析の結果、5 倍以上発現が強くなる遺伝子は 164 あり、そのうち 36 遺伝子は 10 倍以上の発現増強がみられた。また、遺伝子発現が 1/2 倍より弱くなる遺伝子は 360 あり、そのうち 19 遺伝子が 1/3 以下に抑制されていた。変動の大きかった遺伝子をそれぞれ以下の表に示す。

Angpt12 により発現に変化のみられた遺伝子

増加倍率			倍率		
152	Ldha	lactate dehydrogenase A	0.15	St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1
54	Grn	granulin	0.26	Olfr295	olfactory receptor 295
47	Rpl3	ribosomal protein L3	0.27	Hps4	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog
25	Eno1	enolase1alpha	0.28	Copb1	coatamer protein complex, subunit beta 1
21	Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4	0.28	Ptplad2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
20	Ftl2	ferritin light chain 2			
19	Tmbim6	TM BAX inhibitor motif containing 6	0.28	Olfr575	olfactory receptor 575
18	EF1a	Elongation factor 1 alpha	0.29	Gpr155	G protein-coupled receptor 155
17	Gpx4	glutathione peroxidase 4	0.30	Gpr34	G protein-coupled receptor 34
17	Apoe	apolipoprotein E	0.31	Vps25	vacuolar protein sorting 25 (yeast)
16	Gnb2	guanine nucleotide binding protein, beta 2	0.31	Cxcl4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
15	EG434782	ARP2/3 complex 41 kDa subunit			

4. 考察 まとめ

Angpt12-Flag 蛋白質の精製過程で酸による溶出を行なった場合、温和な条件で中性に戻しても、精製された Angpt12 は、LILRB2 の発現とは関係なく、あらゆる培養細胞に強く結合するようになり、非特異的な生理作用を示すと考えられた。このため、これまでに知られている Angpt12 の作用の中には、この非特異的な結合に起因する現象が含まれている可能性もある。実際、Flag ペプチドで精製した Angpt12 を用いて血管内皮細胞への作用を確認したところ、Akt の活性化などを確認する事はできなかった。しかし、今回 Flag ペプチドで溶出した Angpt12-Flag 蛋白質はこれまで、トランスフェクションにより産生させ、コンディショナルメディアムとして使用していた Angpt12-flag 蛋白質と同様に、293T 細胞に発現させた LILRB2 と特異的に結合することから、生理活性を保持した蛋白質であると考えられ、本研究で使用する事とした。

精製した Angpt12-flag は in vitro での造血幹細胞の増幅活性を持っていたが、骨髄由来マクロファージに対する生理活性は見られなかった。また、J774、RAW264 マクロファージ細胞株に対しても LPS 刺激による TNF α 、IL-6、IL-10 の産生には影響を与えなかった。しかし、骨髄由来マクロファージの分化をモデルにした場合、Angpt12 は、M1 様マクロファージの特徴を強くする方向に働いており、どちらかといえば、炎症を惹起するサイトカインのような働きをしている可能性が高い。

さらに、最近、Angpt12 添加により、細胞の運動性が上昇する免疫細胞を単離したところ、その単離した細胞群に対して Angpt12 は TNF α と IL-6 といった炎症性サイトカインの産生を誘導する事が分かってきた。今後は、その免疫担当細胞に対する Angpt12 の作用機構の解析を行う事によっても、Angpt12 による免疫制御機構の解明を進めていく予定である。

5. 参考文献

- Tabata et al. *Cell Metab.* 2009, 10:178-88
 Zheng J. et al. *Nature* 2012, 485, 656-660.