

論文内容の要旨

Methods for accurate targeting of activated macrophages and imaging spatiotemporal dynamics of hydrogen peroxide in the plasma membrane

(活性化マクロファージの高選択的ターゲティングを実現する方法
及び細胞膜における過酸化水素の時空間動態を可視化する方法)

氏名 鈴木 秀幸

【序】

疾患の発生機序の理解，それにもとづく新しい診断法・治療法の開発のためには，疾患細胞や疾患に関与する生体分子の挙動を正確に，感度よく追跡できる分析法が必要不可欠である．そのような分析法の構築には，酵素や抗体，受容体タンパク質などが生体分子を認識する精密なメカニズムを利用した分子プローブが有効である．本博士課程では，1) 疾患細胞を選択的に可視化する分子プローブ，ならびに2) 多様な生命機能と疾患に関与する過酸化水素の蛍光プローブの開発研究を行った．

【研究1：疾患細胞を選択的に可視化する分子プローブ】

【背景と目的】

疾患細胞の細胞膜に過剰発現した細胞表面タンパク質は，抗体などを利用して可視化試薬や薬物を疾患細胞に送達する際の目印とされる．しかし，目印となる細胞表面タンパク質が正常細胞にも発現している場合があり，選択性という点で，この手法は必ずしもすべての疾患細胞種に有効なアプローチではない．そこで筆者は，癌細胞や動脈硬化病変部位に集積した活性化マクロファージなど多くの疾患細胞において，細胞表面タンパク質の発現に加えてタンパク質分解酵素の発現が亢進していることに着目した．すなわち，特定の細胞表面タンパク質とタンパク質分解酵素を共に発現する細胞のみを認識するように分子プローブをデザインすれば，それは疾患細胞に対してより高い選択性を獲得すると考えた．

【原理】

免疫細胞であるマクロファージは，生体をウイルスや細菌の感染から防御する一方で，動脈硬化病変部位に集積して活性化し，病態の進行を促進する．この活性化マクロファージは，肝臓などの正常組織に常在しているマクロファージとは異なりマトリクスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) を過剰に分泌している．そこで，このプロテアーゼによる切断を受けたときに初めてマクロファージに取り込まれる分

子プローブをデザインした (図 1)。本分子プローブの細胞表面タンパク質結合部位はアポリポタンパク質 B のペプチドセグメント (ApoB₅₄₇₋₇₃₅) から成り、マクロファージのスキャベンジャー受容体 (SR) と結合する。この ApoB₅₄₇₋₇₃₅ は、大腸菌シャペロンタンパク質 Trigger Factor (TF) からなる自己阻害部位 (図 1, マゼンタ) によってマスクされており、一時的に SR との結合が妨げられている。ApoB₅₄₇₋₇₃₅ 部位と TF 部位の間には MMP-9 で効率よく切断されるペプチド配列 Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Tyr-Ser-Gly (図 1, 赤) が挿入されており、MMP-9 による切断に応じて ApoB₅₄₇₋₇₃₅ 部位が TF 部位から解放され、SR と結合可能になる。従って本分子プローブは、SR, または MMP-9 のみを発現している細胞には取り込まれないが (図 2, B, C), 活性化マクロファージのように、SR と MMP-9 を共発現した細胞によって選択的に取り込まれる (図 2, A)。また、リポーター部位 (図 1, 緑) として蛍光タンパク質や生物発光タンパク質を導入することで、本プローブの細胞内への取り込みを光学的に検出できる。

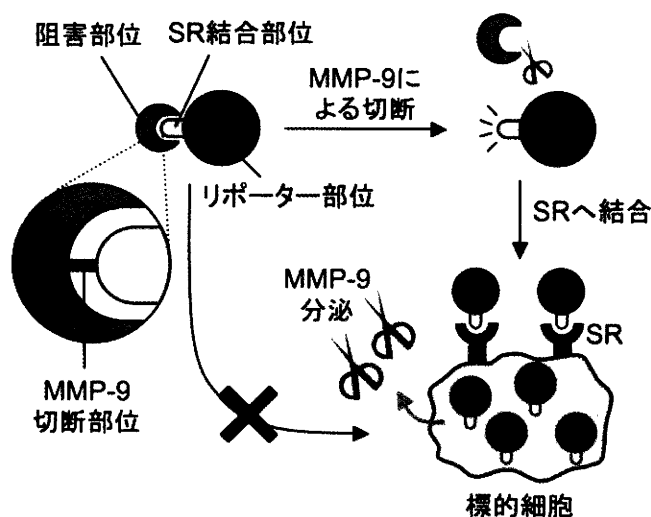


図1 疾患細胞を高選択的にターゲティングする分子プローブの原理。

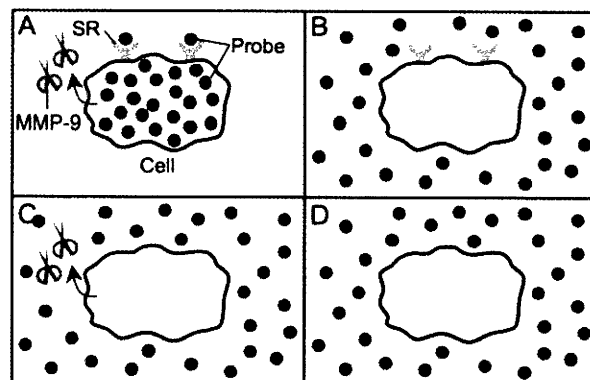


図2 疾患細胞に対する二重の選択性. Aのように、SRとMMP-9両方を発現する細胞はプローブを取り込む。SRのみ(B)、またはMMP-9のみ(C)を発現する細胞はプローブを取り込まない。SRおよびMMP-9を発現しないDのような細胞もプローブを取り込まない。

【結果】

リポーター部位に緑色蛍光タンパク質 GFP を導入した分子プローブを作製した (TF-M-ApoB-GFP と命名)。活性化マクロファージのモデル細胞として、SR を内在的に発現するマウスマクロファージ RAW 細胞に活性型 MMP-9 を過剰発現させた (RAW^{MMP-9(+)})。この RAW^{MMP-9(+)} 細胞とウシ血管内皮細胞を共培養し、動脈硬化病変部位を in vitro で再現した。この共培養系に TF-M-ApoB-GFP を添加したところ、RAW^{MMP-9(+)} 細胞にのみ TF-M-ApoB-GFP の取り込みが見られた (図 3)。この結果は、TF-M-ApoB-GFP は血管内皮細胞のように SR, MMP-9 のどちらも発現していない細胞には取り込まれず、SR と MMP-9 を共発現する活性化マクロファージにのみ選択的に取り込まれることを示している。次に、ヒト由来の細胞を対象として本分子プローブの取り込みを検証した。ヒト末梢血由来の単球 (マクロファージ前駆細胞)、及びヒト常在性マクロファージには本分子プローブは取り込まれなかった。一方、本プローブ分子はリポポリサッカライドによって活性型 MMP-9 の分泌を促進されたヒト活性化マクロファージに取り込まれた (図 4)。以上の結果から、動脈硬化病変部位に集積している活性化マクロファージのように、SR と MMP-9 両者を発現している細胞によって TF-M-ApoB-GFP および TF-M-ApoB-rLuc は限定的に取り込まれることが実証された。

本法は、動脈硬化などの炎症性疾患に重要な関わりを持つ活性化マクロファージを対象とした細胞選択的な治療法や早期診断法の開発に繋がると期待できる。また本法は、動脈硬化だけでなく癌や神経変性病などの疾患細胞のように、タンパク質分解酵素を過剰発現する多くの疾患細胞種に応用可能であると期待できる。

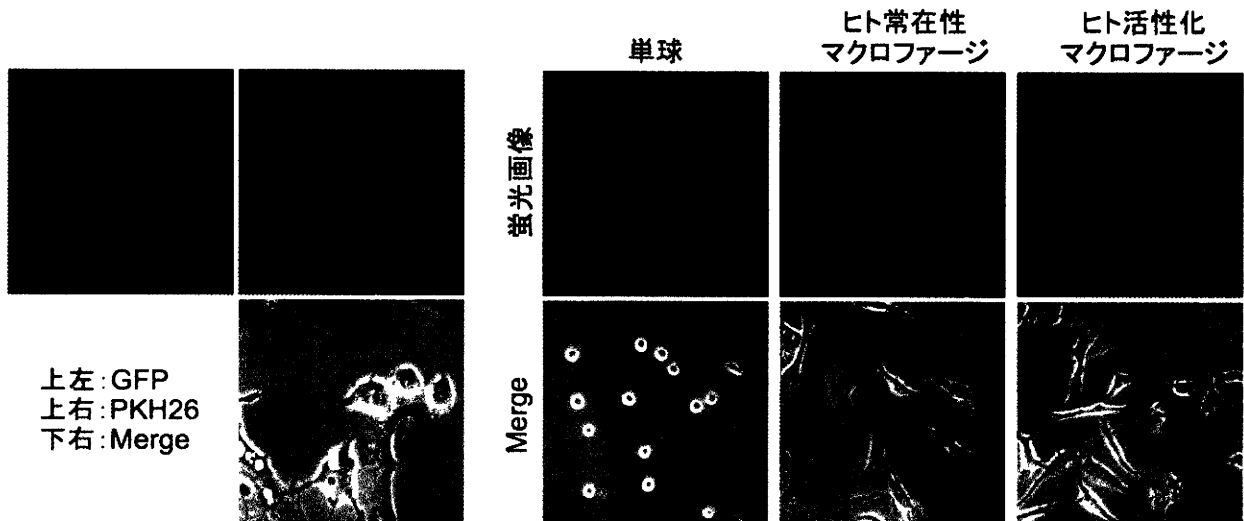


図3 TF-M-ApoB-GFPによるマクロファージの選択的ターゲティング。RAW^{MMP-9(+)}細胞をウシ血管内皮細胞と共培養した。緑、細胞内へ取り込まれたプローブ分子の蛍光。赤、細胞膜染色剤PKH26でラベルされたウシ血管内皮細胞。

図4 TF-M-ApoB-GFPによるヒト活性化マクロファージの選択的ターゲティング。ヒト常在性マクロファージはヒト末梢血由来単球を7日間無血清培地で培養して得た。ヒト活性化マクロファージはヒト正常マクロファージにリボポリサッカライドで24時間処理して得た。

【研究2：過酸化水素の蛍光プローブ】

【背景と目的】

活性酸素種のひとつである過酸化水素 (H_2O_2) は、新しい細胞内シグナル伝達物質として近年急速に認識されつつある。 H_2O_2 のシグナル伝達物質としての役割は、細胞遊走や細胞増殖、遺伝子発現、神経伝達の調節など、実に多様な細胞機能の制御に関与していることがわかってきた。その調節機構の破綻は、癌や動脈硬化など多数の疾患の発症・進展と深く関連している。そのため、 H_2O_2 の細胞内動態を明らかにすることは、 H_2O_2 による細胞機能の調節機構を理解する上で鍵となる重要な問題である。しかし、 H_2O_2 の細胞内イメージングに用いられてきたジクロロフルオレセインのような有機蛍光色素は、 H_2O_2 と不可逆的に反応して蛍光を発するため、単一細胞内で H_2O_2 濃度の増減を詳細に追跡することは不可能であった。また、 H_2O_2 に対する選択性・感度も既存の蛍光色素では不十分であった。更に、ほとんどの有機蛍光色素は細胞内の特定部位に局在化させることができないため、細胞内 H_2O_2 動態の空間的な情報が得ることが難しいという問題がある。そこで、既存の有機蛍光色素が抱える問題点を克服する H_2O_2 の蛍光プローブを開発し、 H_2O_2 がどのように細胞機能を時空間的に制御しているかを明らかにする。

【原理】

H_2O_2 の選択的な分子認識のため、酵母の酸化ストレスセンサータンパク質である Yap1 と Orp1 を用いた。細胞内の H_2O_2 濃度が上昇すると、本プローブの Orp1 部位の Cys36 が選択的に酸化され、Yap1 部位のカルボキシ末端側の cysteine-rich domain (cCRD) 内の Cys598 と一過的にジスルフィド結合を形成する。その Orp1-cCRD 間のジスルフィド結合は、Yap1 部位のアミノ末端側の cysteine-rich domain (nCRD) 内の Cys303 と cCRD-Cys598 とのジスルフィド結合に転移される。その結果、Yap1 部位は図5aのように大きく構造変化する。この H_2O_2 依存的な Yap1 部位の構造変化を、シアン色蛍光タンパク質 CFP から黄色蛍光タンパク質 YFP への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化として検出する。本蛍光プローブの最大の特徴は、細胞内の H_2O_2 濃度が減少すると、チオレドキシシン等の細胞内に内在する抗酸化タンパク質によって nCRD-cCRD 間のジスルフィド結合が還元され、再び H_2O_2 と応答可能な状態に戻ることである。筆者は本蛍光プローブを「Perry」と命名した。

【結果】

遺伝子工学的手法を用いて Perry をコードする cDNA を作製し、大腸菌を用いてタンパク質 (Perry) を発現、アフィニティクロマトグラフィーで精製した。H₂O₂ に対する Perry の選択性を *in vitro* で検討した。H₂O₂ を添加すると Perry から FRET が観察されたが、NO、ONOO⁻、OCI⁻、O₂⁻ 添加時には FRET は観察されなかった。また、Perry は 0.5 μM から 100 μM までの H₂O₂ を定量的に検出することを示した。Perry を発現する培養細胞に H₂O₂ を繰り返し添加し、Perry は H₂O₂ 濃度の増減を可逆的に検出できることを示した。以上 Perry が、既存の有機蛍光プローブでは不可能であった、H₂O₂ の高選択的・高感度・可逆的視覚化計測を実現することを実証した。次に、細胞膜上での H₂O₂ の動態を正確に知るために、遺伝子工学的に Perry を細胞膜へ局在化させた (Perry-PM と命名)。Perry-PM を細胞膜上に発現する血管内皮細胞に、細胞遊走を促進することが知られているアンジオテンシン II を添加した (図 5 b)。その結果、H₂O₂ は細胞膜上に一様に発生するのではなく、ラメリポディアと呼ばれる、細胞遊走に重要な特定の膜構造内に限局して発生していることが分かった。以上、Perry は、H₂O₂ による細胞機能の時空間的な制御機構を解明するための強力なツールであることを示す。

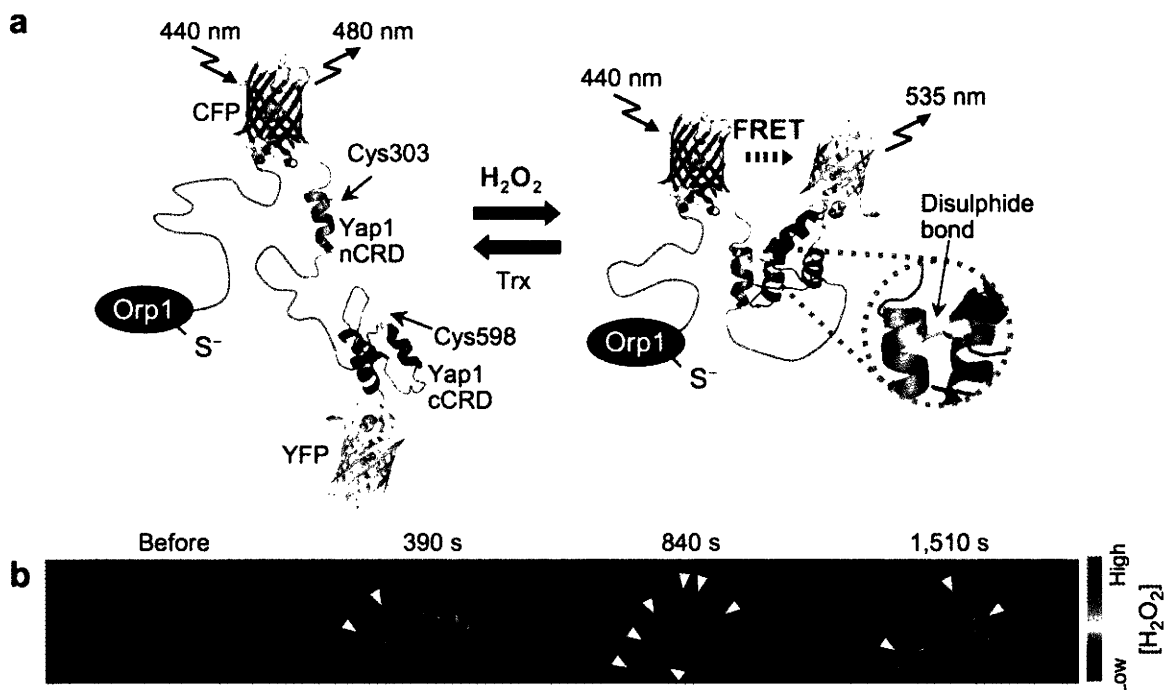


図5 Perry による過酸化水素(H₂O₂)の細胞内動態の可視化. a) Perry の原理. H₂O₂ によって FRET 効率が增加する. nCRD-cCRD 間のジスルフィド結合が細胞内のチオレドキシン(Trx)などで還元されることで、Perry は再び H₂O₂ と反応することができる. b) 細胞膜における H₂O₂ の動態. 細胞膜に局在化させた Perry-PM を血管内皮細胞に発現させ、100 nM アンジオテンシン II で細胞遊走を促す刺激した. 図5b は、血管内皮細胞内の、ラメリポディアが活発に形成されている領域を示す. 矢頭は細胞膜に形成されたラメリポディアを指す. このように H₂O₂ は、ラメリポディアという、細胞が移動する際に重要な特定の膜構造内に限局して発生していることが分かった.

【まとめ】

本博士課程では、動脈硬化の発症・進展に重要な活性化マクロファージを特異的に可視化する分子プローブを開発した。これにより、活性化マクロファージを対象とした細胞選択的な治療法や早期診断法の開発に繋がると期待できる。さらに、多様な疾患の病因・病態や老化現象と深く関与しているシグナル伝達物質 H₂O₂ を可視化する蛍光プローブを開発した。本蛍光プローブにより、遊走する血管内皮細胞内において、H₂O₂ の発生はラメリポディアと呼ばれる細胞遊走に重要な特定の膜構造内に限局していることを初めて明らかにした。