

超高感度リン酸化プロテオミクスによる M1/M2 マクロファージ分化機構の解明と、腫瘍関連マクロファージリプログラミング治療への応用

愛知県がんセンター研究所
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 主任研究員
阿部雄一

愛知県がんセンター研究所
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 分野長
田口歩

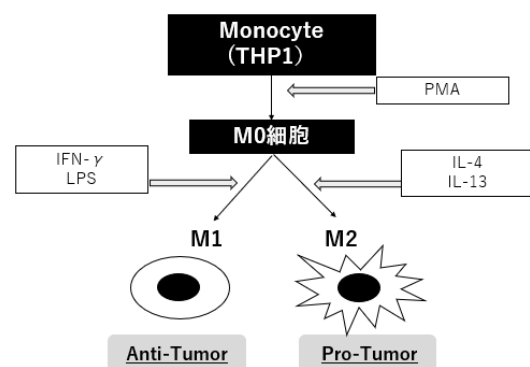
1. 研究の目的・背景

がん細胞周辺の微小環境には多くのマクロファージが浸潤しており、これらマクロファージは腫瘍関連マクロファージ（以下 TAM）と呼ばれている。TAM は肝細胞がん、乳がん、食道がん子宮内膜がんといった多くのがんにおいて、がん悪性化に寄与する作用を持つことが明らかとなった（Ref1）。

これまでに、TAM は Type2 型マクロファージ（M2）と近い、免疫抑制的な機能を発揮することが明らかになりつつある（Ref2）。M2 マクロファージ様の TAM が蓄積されているがんでは予後が優位に悪いため、M2 マクロファージ型 TAM の除去や、免疫活性化能を持つ M1 マクロファージ型へのリプログラミングを目指した治療法の構築が急務であった。

TAM のリプログラミングのために、M1/M2 マクロファージへの分化システムを理解する必要がある（図1）。M1/M2 マクロファージへの分化の初期段階に p38MAPK を介したシグナル伝達の重要性が報告されたものの（Ref3）、M2 特異的な分化スイッチに関するリン酸化シグナル経路はいまだ明らかではない。

図1：M1/M2マクロファージ分化と機能



近年、網羅的なリン酸化プロテオミクスの技術がなされる一方で、細胞系列に沿った網羅的なリン酸化プロテオミクス解析は現在も十分な解析が行われていない。その理由として、リン酸化プロテオミクスには通常のタンパク質発現プロテオミクスに比べて100倍以上のタンパク質を必要とする点があげられる。それぞれの分化段階ごとにリン酸化プロテオミクスに見合う量の細胞を調整することは現実的ではなかった。

申請者は、サンプルロスの低減・リン酸化ペプチド濃縮の最適化・質量分析計パラメーターの最適化により、ごく微小な内視鏡検体(約 2mm^3)から10000個以上のリン酸化サイトを同定可能な超高感度リン酸化プロテオミクスの構築に成功している(Ref4)。以上の経緯から、申請者はM1/M2マクロファージへの超高感度リン酸化プロテオミクス、およびキナーゼ活性プロファイリング計算を基盤とした本研究計画を立案した。

2. 研究の対象ならびに方法

【THP1細胞からのマクロファージ分化誘導と、オルガネラ分画】

M1/M2細胞の分化には、急性単球性白血病細胞株THP1を使用した。分化誘導は先行報告の手法に倣って進め、M1/M2マーカー(CD80・CD206)発現を基準として分化効率を評価する。更にリン酸化プロテオミクスの網羅性を高めるため、市販の核・ミトコンドリア分画キットを利用し、オルガネラの分画を実施した。同時に、ビオチンラベル法を利用した細胞表面プロテオミクスも実施した。

【超高感度リン酸化プロテオミクス用サンプル前処理】

本研究計画では申請者らの開発した超高感度リン酸化プロテオミクス法(Ref)を採用し、リン酸化プロテオミクス用のサンプル調整を行った。リン酸化ペプチド濃縮には鉄イオンIMAC法を使用した。さらに存在量の少ない高深度チロシンリン酸化データ取得のため、申請者が構築したチロシンリン酸化プロテオミクスも実施した(Ref5)。定量ラベルとして、TMT10plex試薬を使用した。TMTラベルペプチドの分画は、High pH逆相クロマトグラフィーによる15分画(発現プロテオミクス)、少量サンプルにはSCX/C18 stage-tipによるpH-saltベースの7分画(リン酸化プロテオミクス、細胞表面プロテオミクス)を実施した。

【LC-MS/MSによるデータ取得とタンパク質同定】

各プロテオミクス用サンプルは、名古屋大学医学部分析部門に設置されているQ Exactiveにて解析した。得られた質量分析計データを、フリーのリン酸化部位同定ソフトMaxQuantにアップロードし、各リン酸化部位の定量情報を取得した。

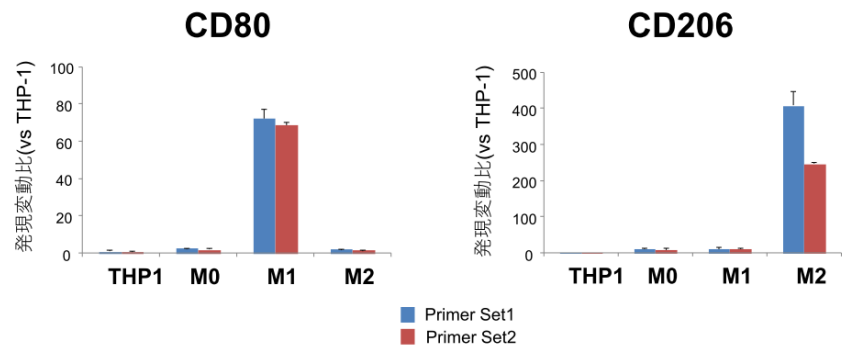
申請者が先行研究(Ref6)にて独自に考案した方法を用いてM1/M2マクロファージ特異的な活性化キナーゼを推定し、M1/M2マクロファージ分化スイッチ責任キナーゼの候補群を

選別した。また併せて Webgestalt による Pathway 解析も実施し、M1/M2 マクロファージ特異的な変動を示すリン酸化シグナル伝達経路を抽出した。

図2 qRT-PCRによるM1/M2マクロファージ分化マーカーの検討

3. 研究結果

THP-1、およびそこから分化させた M0, M1 M2 マクロファージ様細胞を調整した。M1, M2 マーカー（それぞれ CD80、CD206）の発現上昇を、qRT-PCR



によってそれぞれ確認した (図 2)。THP1 細胞に比べて、CD80 および CD206 mRNA 発現が 60 ~400 倍に増加しており、かつその増加は M1 および M2 分化条件特異的に観察された。

これらのサンプルから、発現プロテオミクス、細胞表面プロテオミクス、リン酸化プロテオミクス、チロシンリン酸化プロテオミクスを実施した所、タンパク質もしくはリン酸修飾同定数は、6348 タンパク質、4602 タンパク質、9257 リン酸化部位、1051 チロシンリン酸化部位、であった。これらの定量データを用いて、Pathway 解析を実施した。M0 に対して M1、M2 細胞で有意な活性化を示した Pathway、ならびに M1 と M2 細胞間で活性差を示す Pathway を図 3 にまとめた。Pathway 解析レベルでも、M1/M2 分化を裏付ける結果が得られた。例えば、Type 2 Interferon signaling (IFN γ)の活性化、今回の M1 分化プロトコルで IFN γ を使用した点と一致している。また M2 型分化で活性化している PPAR signaling pathway についても、先行研究で M2 型マクロファージ分化との関連が既に明らかにされた (Ref7)。これらの結果から、今回プロテオミクス解析を実施したサンプルは、タンパク質プロファイリングレベルでも確かに M1/M2 型マクロファージ様の性質を示す事が明らかとなった。

図3 Whole cell lysate Proteomicsを用いたPathway解析結果

geneSet	description	M1vsM0	M2vsM0	M2vsM1
WP477	Cytoplasmic Ribosomal Proteins	2.065458	2.77873	2.42049
WP3942	PPAR signaling pathway		1.791773	1.81543
WP3915	Angiotensin Like Protein 8 Regulatory Pathway		1.862535	1.662429
WP107	Translation Factors		2.106055	1.635787
WP306	Focal Adhesion		1.959462	1.50082
WP3865	Novel intracellular components of RIG-I-like receptor (RLR) pathway	2.109139		-1.79244
WP183	Proteasome Degradation	1.913238		-1.79382
WP2877	Vitamin D Receptor Pathway	1.885718		-1.80932
WP2431	Spinal Cord Injury	2.032522		-1.8663
WP75	Toll-like Receptor Signaling Pathway	2.34635		-1.94826
WP1449	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	2.236334		-1.9837
WP619	Type II interferon signaling (IFNG)	2.27862		-2.24317
WP2328	Allograft Rejection	2.428924		-2.25571

赤字：活性化(p < 0.05)
 緑字：不活性化(p < 0.05)

リン酸化プロテオミクスデータを利用した、キナーゼ活性プロファイリング結果を図4にまとめた。興味深いキナーゼ群として、TEC family kinase (BMX, BTK, TEC: 図4中の太字キナーゼ)の活性変動が観察された。BTKについては、既に先行研究にてM1型マクロファージ分化に関する事が報告されており(Ref8)、我々のキナーゼ上流解析でもM1特異的に活性化する事が確認された。さらに、M2型、M1型の間でキナーゼ活性の差を比較した場合、TECキナーゼはM1で最も活性化、一方BMXはM2型で最も活性化する事が明らかとなった。TEC family kinase 阻害剤はfamily内のkinase全般に効果を示す事から、BMX, BTK, TECキナーゼの構造で規定される基質特異性の範囲は大差ないと考えられる。すなわち、アダプタータンパク質や、細胞内局在などのメカニズムによって、TEC family kinaseのM1/M2型特異的なシグナル伝達活性化が示唆された。

図4 Phosphoproteomicsを用いた上流キナーゼ解析結果

Kinase	M1vsM0	M2vsM0	M2vsM1
TEC	2.309	-3.789	-5.242
PDK1	4.462	-0.920	-4.935
ARAF	3.051	-2.124	-4.330
EIF2AK2	3.552	-0.731	-3.929
STK11	4.876	1.649	-3.694
MAP2K3	3.539	0.180	-3.332
MAPK1	1.734	-2.275	-3.152
TRKA	3.595	0.315	-3.013
RAF1	3.566	0.914	-2.895
MAP3K8	2.561	-0.613	-2.886
CSNK2A1	1.719	-1.708	-2.775
INSR	1.701	-1.412	-2.725
MAPK8	2.742	0.124	-2.597
PKD2	1.865	-1.073	-2.502
PKD1	3.012	0.713	-2.480
TBK1	2.814	0.449	-2.454
STK3	2.944	0.835	-2.334
PDPK1	1.910	-0.679	-2.295
MAPK10	2.828	0.749	-2.276
MAPK9	1.684	-0.857	-2.190
BTK	2.592	0.306	-2.116
MTOR	2.843	1.496	-1.817
MAK	1.030	4.188	1.670
MARK2	-0.329	2.511	1.920
CSNK1A1	-0.212	2.777	1.974
PTK2	-0.895	1.682	2.193
BMX	0.422	3.555	2.544

4. 考察

ここまでの結果から、M1、M2型マクロファージ特有のタンパク質発現、Pathway活性化が観察され、その一部はTAM活性化との関連を報告した先行研究と一致していた。この事から、THP-1分化モデルとTAMとの相関が我々のデータから改めて確認され、TAM治療候補分子の探索に当たり、我々の持つ多層プロテオミクスデータの重要性が強調された。

本年度予定していたオルガネラプロテオミクス(核・ミトコンドリア)については、2019年度中にプロテオミクス解析が完了しなかったため、まだ定量データが得られていない。これらのサンプルの解析が完了し次第、核・ミトコンドリアプロテオミクス解析と、既に取得した全細胞Lysate、細胞表面タンパク質データとの統合も行う。M1、M2型マクロファージにおいて、ミトコンドリア形状の変化ならびに脂質代謝の変化が報告されている事からも(Ref9)、ミトコンドリアタンパク質は有望なTAM治療分子標的と考えられる。

今後の展開として、まず多層プロテオミクスデータ間の統合解析を実施する予定である。今回、全細胞Lysateのタンパク質発現では変動の無いものの、細胞表面プロテオミクスでは大きな変動を示すタンパク質が多数発見された。これらのタンパク質は細胞内局在レベルの制御を受けている可能性が考えられ、我々の細胞表面プロテオミクスで初めてとらえ

られるような新規標的分子となる可能性を秘めている。核・ミトコンドリア分画で同定されたタンパク質も含めてこのような候補分子には、共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在の比較検討を進める予定である。

今後は候補分子の発現を qRT-PCR, Western blotting レベルで検証する。M2 型特異的な発現変動が認められるタンパク質については、阻害剤や siRNA 処理による発現阻害を実施し、M2 型分化条件における細胞増殖能や、分化転換に与える影響を検討する予定である。

5. 文献

- Ref1: Nat Rev Clin Oncol. 2017 Jul;14(7):399-416.
Ref2: Trends Immunol. 2019 Apr;40(4):310-327.
Ref3: Proteomics. 2015 Feb;15(4):773-86.
Ref4: Theranostics. 2020 Jan 12;10(5):2115-2129.
Ref5: J Proteome Res. 2017 Feb 3;16(2):1077-1086.
Ref6: Sci Rep. 2017 Sep 5;7(1):10463.
Ref7: Front Immunol. 2015 May 26;6:263
Ref8: PLoS One. 2014 Jan 21;9(1):e85834.
Ref9: Oncogene. 2019 Jun;38(25):5007-5020.

6. 論文発表

特になし