

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11079

研究課題名(和文) エンド・リソソーム性タンパク質分解の破綻による慢性炎症増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of chronic inflammation exacerbation mechanism due to breakdown of endo-lysosomal proteolysis

研究代表者

門脇 知子(筑波知子)(KADOWAKI, Tomoko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：70336080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病や根尖性歯周炎、シェーグレン症候群など歯科系疾患には難治性の慢性炎症を呈するものが多い。本研究の目的は、慢性炎症の原因として、エンド・リソソーム性タンパク質分解の異常が内的刺激物質の蓄積を起こすことにあり、それが炎症の遷延化と重篤化を招くことを示すものである。我々はプロテアーゼの欠損が慢性炎症やマクロファージの機能異常・脂肪組織の分化異常を引き起こすことを見出した。本研究は口腔内疾患の大部分を占める慢性炎症に留まらず、全身性の炎症における慢性化メカニズムの一面を解明するものである。

研究成果の概要(英文)：Dental diseases such as periodontal disease, apical periodontitis, and Sjogren's syndrome often exhibit intractable chronic inflammation. The aim of this study is to show that abnormal endo-lysosomal proteolysis causes accumulation of internal irritants as a cause of chronic inflammation, which leads to prolonged and severe inflammation. We found that deficiency of protease causes chronic inflammation and dysfunction of macrophage and adipose tissue differentiation. This study is not limited to chronic inflammation which accounts for the majority of oral diseases, and it clarifies one aspect of the chronic mechanism of systemic inflammation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：生体応答 エンドソーム リソソーム タンパク質分解 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

炎症とは、さまざまな生体侵襲物に対する重要な生体防御反応である。従来は、微生物感染、異物侵入、紫外線・放射線照射など外的侵襲によってもたらされると考えられてきた。近年、生体内代謝産物の異常蓄積や壊死細胞由来の核酸や生理活性物質によっても炎症が惹起されることがわかってきた。このように内的刺激物質 (DAMP: damage-associated molecular pattern) による非感染性炎症は、「自然炎症」と呼ばれ、病原体など外的刺激物質 (PAMP: pathogen-associated molecular pattern) による炎症と区別されている。炎症の開始段階では、組織細胞や浸潤白血球、血漿成分・血小板由来の生理活性物質が重要な役割を果たすことが多くの研究で明らかにされている。しかし、それに引き続く炎症の遷延化や不可逆化においては未解明の部分が多く残されており、DAMP の蓄積が重要と考えられるようになったものの、なぜ DAMP の蓄積が起こるのか、その機序について詳細はわかっていない。

我々は、エンド・リソソーム性プロテアーゼ (タンパク質分解酵素) の 1 つであるカテプシン E の欠損マウスを作製し、このマウスがアトピー性皮膚炎を発症することを見出した。さらに、このカテプシン E 欠損マウスが、皮膚炎の原因となる黄色ブドウ球菌 *S. aureus* や歯周病原性細菌である *P. gingivalis* に易感染性を示すことを明らかにした。この原因として、カテプシン E 欠損マウスではマクロファージの機能異常による殺菌能の低下がみられること、また、この機能異常が免疫応答に必須な受容体が細胞内に蓄積しているためであることを見出した。その受容体とはパターン認識受容体 (PRR) と呼ばれるもので、病原体センサーである TLR (Toll-like receptor) や NLR (NOD-like receptor) などが含まれる。PRR は、本来細菌やウイルスの成分を特異的に認識し、炎症反応を惹起する受容体として同定されたが、最近では、病原体由来リガンドばかりではなく、宿主由来の細胞成分である内因性タンパク質もリガンドとして認識し、炎症を惹起することがわかってきた。すなわち、PRR は、宿主由来のタンパク質である HSP60、HSP70、gp96 などの DAMP も認識し、炎症性サイトカインを産生する。以上のように、カテプシン群の欠損によるエンド・リソソーム性タンパク質分解の低下は、慢性炎症を惹起することから、エンド・リソソーム性プロテアーゼが、DAMP や PRR の蓄積と炎症の遷延化に参与しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

歯周病や根尖性歯周炎、シェーグレン症候

群など歯科系疾患には難治性の慢性炎症を呈することが多い。本研究の目的は、慢性炎症の原因として、エンド・リソソーム性タンパク質分解の異常が内的刺激物質の蓄積を起こすことにあり、それが炎症の遷延化と重篤化を招くことを示すものである。これまでの研究で生理活性物質やパターン認識受容体が重要な役割を果たす炎症の開始機序についてはよく理解されるようになったが、なぜ炎症が慢性化するのかについては不明な点が多い。我々はプロテアーゼの欠損が慢性炎症やマクロファージの機能異常・脂肪組織の分化異常を引き起こすことを見出した。本研究は口腔内疾患の大部分を占める慢性炎症に留まらず、全身性の炎症における慢性化メカニズムの一面を解明するものである。

3. 研究の方法

(1) カテプシン群欠損による内在性タンパク質蓄積

カテプシン E 欠損マウス由来の細胞には、正常細胞では観察されないタンパク質が多数蓄積している。例えば欠損マウス由来のマクロファージや樹状細胞には LAMP-1、LAMP-2 等のリソソーム膜タンパク質が蓄積し、PRR である TLR2 や TLR4、ケモカインレセプターである CCR2 や FPR も細胞表面発現が減少し、細胞内に蓄積していることを報告している。そこで、本研究では、カテプシン E 欠損マウス細胞における蓄積タンパク質を解析し、病原体センサーの内因性リガンドとしての可能性について調べる。

(2) カテプシン欠損によるファゴサイトーシスの機能変化

カテプシン E 欠損マウスではマクロファージの機能異常による殺菌能の低下がみられることを見出した。そこでカテプシン E の局在するコンパートメントと取り込んだ細菌の局在するオルガネラを比較した。腹腔マクロファージ (5×10^5) に対して MOI : 100 (細胞 1 に対して細菌を 100) で 10% FBS を含む正常 RPMI-1640 培地中で感染させ 30 分間インキュベートした。4% パラホルムアルデヒド含有 PBS にて室温、30 分間固定し、それぞれ 1 次、2 次抗体で染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

(3) カテプシン群のメタボリックシンドロームにおける役割の解明

近年、肥満をはじめとするメタボリックシンドロームは、代謝性疾患としてのみならず、アディポサイトカインや遊離脂肪酸をケミカルメディエーターとする脂肪組織の炎症性疾患としても捉えられている。我々は、カテプシン E 欠損マウスに高脂肪食を給餌す

ると、野生型マウスとは異なった脂肪組織分化を示し、白色脂肪細胞も褐色脂肪細胞も形成不全になることを報告した。その原因の1つとして脂肪細胞におけるマクロファージの数が野生型に対してカテプシンE欠損マウスで有意に少なくなっていることを見出した。したがって野生型とカテプシンE欠損マクロファージの *in vitro* での遊走能を測定した。具体的にはカテプシンE欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、ポリエチレンテレフタレート膜(孔径8 μ m)で隔てられた24ウェルの走化性チャンバーを用いて測定した。マクロファージを上部チャンバーに充填し、培地のみ(対照培地として10%FBSを含むRPMI-1640培地)、MCP-1(0.1nM)またはfMLP(1 μ M)を遊走因子として加えた。下のウェルに移動した細胞をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定し、May-Giemsaで染色し、次いで光学顕微鏡で計数した。

また、実験(1)においてカテプシンE欠損によって酸化ストレスが誘導されていることがわかった。過剰な酸化ストレスは高脂血症や糖尿病、高血圧症などに関与していることがわかっている。そこでメタボリックシンドロームにおいて重要な役割を果たす肝臓と胆嚢における酸化ストレスを野生型マウスとカテプシンE欠損マウスで比較検討した。

(4) カテプシンE機能低下における癌発症と炎症反応のクロストーク解明

慢性炎症が持続すると癌発症率が有意に上昇することが示唆されている。事実、カテプシンE欠損マウスでは、乳癌の自然発症率が有意に上昇する。逆にヒト前立腺癌細胞にカテプシンEを遺伝子導入し発現させたものを、ヌードマウス皮下に移植すると、腫瘍形成・増大が抑制されることを見出している。そこで、野生型マウスにB16メラノーマ細胞を移植し、腫瘍形成と増大の変化を調べた。この時、B16細胞にはカテプシンE遺伝子を導入したものと対照群とで比較した。さらにカテプシンE導入細胞による腫瘍と対照群とでカテプシンEによる癌抑制機能、その欠損による癌発症機構と炎症反応との関連性について調べた。

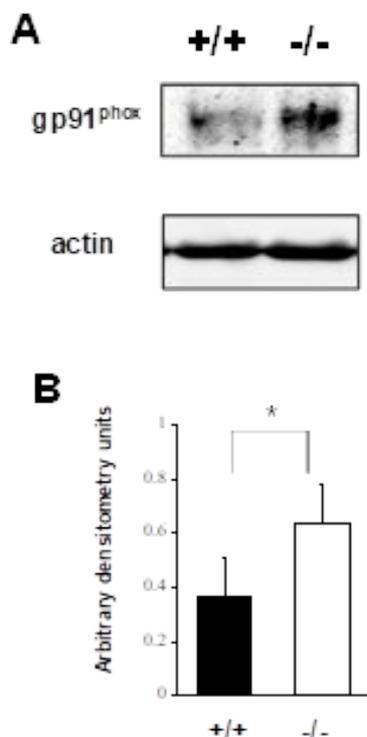
4. 研究成果

(1) カテプシン群欠損による内在性タンパク質蓄積

野生型およびカテプシンE欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、蓄積しているタンパク質を解析した。その過程で野生型マクロファージと比較してカテプシンE欠損マクロファージでは有意に酸化ストレスが高いことが明らかとなったので、NADPHオキシダーゼ(NOX2)の酵素活性を測定した。

野生型マクロファージと比較してカテプシンE欠損マクロファージではNADPHオキシダーゼの酵素活性が約2.5倍上昇していた。更なる分子メカニズムを探るため、各サブユニットのタンパク質量を測定した。NADPHオキシダーゼの6種類のサブユニットの中でファゴソーム膜と結合しているgp91^{phox}のタンパク質量が野生型マクロファージと比較してカテプシンE欠損マクロファージでは有意に蓄積していることが明らかとなった(図1参照)。

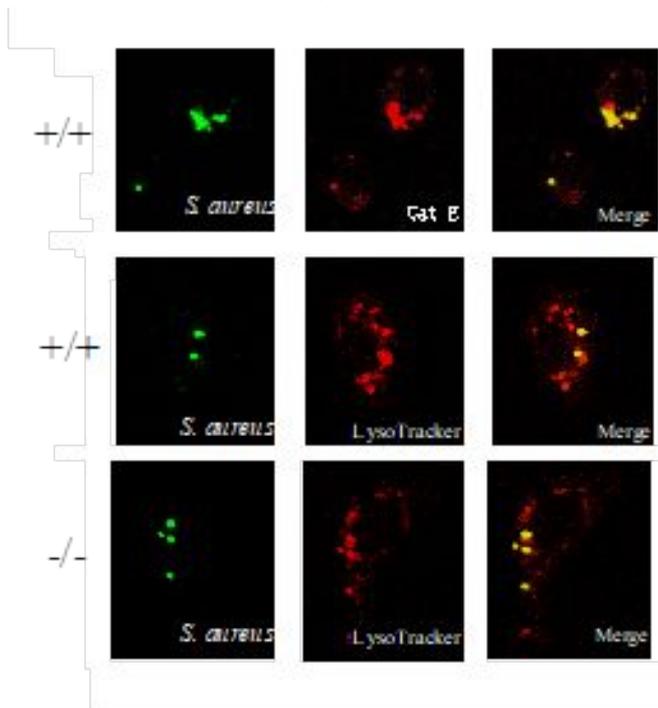
図1: 野生型(+/+)及びカテプシンE欠損(-/-)マクロファージでのgp91^{phox}量の比較



(2) カテプシン欠損によるファゴサイトーシスの機能変化

腹腔マクロファージに対して黄色ブドウ球菌 *S. aureus* を感染させ30分インキュベーションした後、6時間後の局在について共焦点顕微鏡で観察した。*S. aureus* はカテプシンE陽性コンパートメントと共局在していることが分かった(図2上段のカラム)。また、同様に野生型及びカテプシンE欠損マクロファージにおいて *S. aureus* の局在を解析したところ、野生型及びカテプシンE欠損マクロファージ共にリソソームを示すLysoTrackerと共局在することも分かった(図2中段及び下段のカラム)。

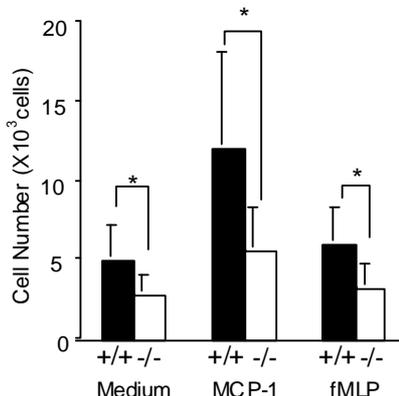
図2：野生型 (+/+) 及びカテプシン E 欠損 (-/-) マクロファージでの *S. aureus* とカテプシン E 及び LysoTracker との共同在



(3) カテプシン群のメタボリックシンドロームにおける役割の解明

野生型及びカテプシン E 欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、ポリエチレンテレフタレート膜で隔てられた 24 ウェルのチャンバーを用いて測定した。マクロファージを上部チャンバーに充填し、培地のみ (対照培地として 10%FBS を含む RPMI-1640 培地) MCP-1 (0.1nM) または fMLP (1 μM) を遊走因子として加えて遊走した細胞数を測定した。図 3 に示すように、どの条件でも野生型に比べてカテプシン E 欠損マクロファージは有意に遊走能が低下していた。これらの結果はカテプシン E 欠損によってマクロファージの遊走能が低下していることが *in vitro* でも示された。

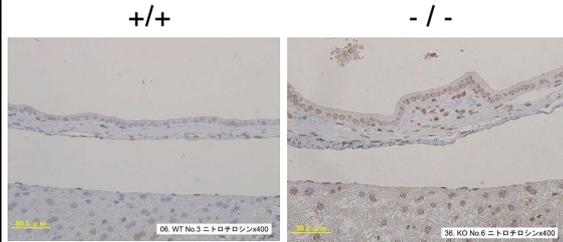
図3：野生型 (+/+) 及びカテプシン E 欠損 (-/-) マクロファージの遊走能



また、酸化ストレスの指標として、高脂肪餌

を給餌した時の野生型マウスならびにカテプシン E 欠損マウスの肝臓と胆嚢を抗ニトロチロシン抗体で免疫染色した (図 4)。

図4：野生型 (+/+) 及びカテプシン E 欠損 (-/-) マウスの肝臓および胆嚢上皮のニトロチロシン染色



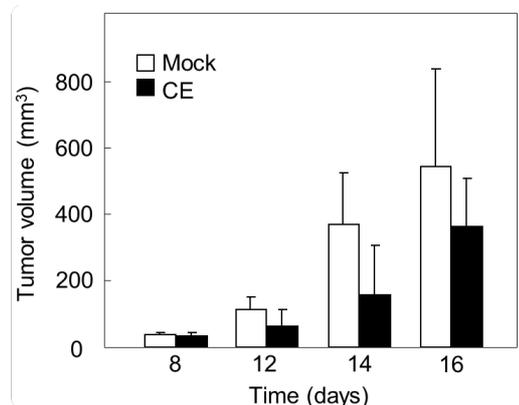
野生型マウスでは 12 匹中 2 匹で胆嚢上皮細胞にニトロチロシンが検出されたが、カテプシン E 欠損マウスでは 12 匹中 8 匹で高度のニトロチロシンが見られた。すなわちカテプシン E 欠損マウスでは強い酸化ストレスがかかっていることが示唆された (図 4)。

(4) カテプシン E 機能低下における癌発症と炎症反応のクロストーク解明

カテプシン E 欠損マウスでは、乳癌の自然発症率が有意に上昇する。逆にヒト前立腺癌細胞にカテプシン E を遺伝子導入し発現させたものを、ヌードマウス皮下に移植すると、腫瘍形成・増大が抑制された。カテプシン E の腫瘍増殖抑制効果を確認するために、マウスメラノーマ細胞 B16 にカテプシン E を発現させ、野生型マウスに移植すると、腫瘍増殖が抑制された (図 5)。

この結果は前立腺癌細胞の結果と一致する。前立腺癌細胞の腫瘍ではカテプシン E の発現により、PF-4 と TIMP-1 が減少し、IL-12、MIG が増加していた。PF-4 は血栓症、播種性血管内凝固症候群(DIC)で増加し、TIMP-1 も炎症応答や腫瘍の転移に関与している。これらが減少して、T 細胞と NK 細胞の活性化に重要な IL-12 および MIG が増加することにより、腫瘍の増殖が抑えられていると考えられた。

図5：カテプシン E 発現の B16 メラノーマ腫瘍増大への影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takii R, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K.: Inhibition of gingipains prevents *Porphyromonas gingivalis*-induced preterm birth and fetal death in pregnant mice. *Eur J Pharmacol.* 2018 Apr 5;824:48-56. 査読有
2. Yamaguchi Y, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T.: Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell Mol. Life Sci.* 2018 Jan;75(1):33-48. 査読有
3. Sakamoto H, Yamashita K, Okamoto K, Kadowaki T, Sakai E, Umeda M, Tsukuba T.: Transcription factor EB influences invasion and migration in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* in press 2018 査読有
4. Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, Zhou Y, Kadowaki T, Nakanishi H.: Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Sci Rep.* 2017 Sep 18;7(1):11759. 査読有
5. Tsukuba T, Sakai E, Nishishita K, Kadowaki T, Okamoto K: New functions of lysosomes in bone cells *J Oral Biosci* 2017 59, 92-95. 査読有
6. Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M, Nakayama K.: A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. *Sci Rep.* 2016 Mar 21;6:23288. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hideharu Yukitake, Yusuke Handa, Tomoko Kadowaki, Keiko Sato, Mikio Shoji, Mariko Naito, Katsumi Imada, Koji Nakayama, A T9SS cargo protein involved in regulation of the T9SS expression in *Porphyromonas gingivalis*. 第 91 回日本細菌学会総会, 大阪, 3 月, 2018
2. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 新規高分子量 G タンパク質 Rab44 は Ca²⁺流入及び NFATc1 経路を介して破骨細胞分化を

負に制御する 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017

3. 坂元裕, 山下健太郎, 岡元邦彰, 門脇知子, 梅田正博, 筑波隆幸: 扁平上皮癌細胞の増殖能・浸潤能・転移能における転写因子 TFEB の役割 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
4. 榎原峻, 坂井詠子, 山口優, 榎原春菜, 門脇知子, 岡元邦彰, 朝比奈泉, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を負に制御する新規 Kelch タンパク質の同定と機能解析 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
5. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と機能解析 第 59 回日本歯科基礎医学会, 松本, 9 月, 2017
6. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と解析 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 大阪, 8 月, 2017
7. 筑波隆幸: エンドソーム・リソソーム機能と骨細胞(シンポジウム) 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎, 3 月, 2017
8. Yicong Liu, Zhou Wu, Tomoko Kadowaki, Hiroshi Nakanishi, The critical roles of gingipains in cell migration and inflammatory responses of microglia through activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2). 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎, 3 月, 2017
9. 雪竹英治, 門脇知子, 内藤真理子, 庄子幹郎, 菊池有一郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* IX 型分泌機構の調節メカニズムに関する分子の解析 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 3 月, 2017
10. Narahara S, Sakai E, Kadowaki T, Yamaguchi Y, Narahara H, Okamoto K, Sumita Y, Asahina I, Tsukuba T. KBTBD11, a novel BTB-Kelch protein, is a negative regulator of osteoclastogenesis through controlling Cullin 3-mediated ubiquitination. 2017 ASCB/EMBO meeting, 2017

〔図書〕(計 1 件)

大谷啓一 監修, 鈴木 邦明・戸苅 彰史・青木 和広・兼松 隆・筑波 隆幸 編 医歯薬出版, 現代歯科薬理学(第 6 版) pp425 (p44-55, p159-163, p265-277) 2018

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mdp.nagasaki-u.ac.jp/frontier/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

門脇 知子 (KADOWAKI, Tomoko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
准教授
研究者番号 : 70336080

(2)研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
教授
研究者番号 : 30264055