

令和元年6月13日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08630

研究課題名(和文) アミノペプチダーゼを介したベーチェット病発症機構の解明と治療基盤の構築

研究課題名(英文) Roles of ER aminopeptidase 1 in inflammation of Behcet's disease

研究代表者

後藤 芳邦 (GOTO, Yoshikuni)

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：90455345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患であるベーチェット病の発症に小胞体アミノペプチダーゼ1(ERAP1)が関与することが報告されている。そこで、ERAP1による炎症誘発機構の解明を目指した。大腸菌由来リポ多糖の腹腔投与によって、ブドウ膜炎を誘発させたマウスでは、刺激に伴って血中に分泌されたERAP1がArgの産生を介して一酸化窒素(NO)の合成を促進することを明らかにした。また、分泌ERAP1は、古典的活性化マクロファージ由来のエキソソームと協調してマクロファージのNO合成や貪食を活性化させることを見出した。以上より、感染刺激などによって分泌されたERAP1がマクロファージの活性化を介して炎症を誘発すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、LPS刺激に伴って分泌されたERAP1あるいは、ERAP1-エキソソーム複合体が、ERAP1活性を介してマクロファージの貪食や一酸化窒素合成を亢進することを見出すことができた。すなわち、ベーチェット病では、細菌感染などをきっかけにマクロファージから血中に分泌されたERAP1が炎症増悪の一因となる可能性が高い。従って、特異阻害剤などによる血中ERAP1活性の抑制が、ベーチェット病やその他の炎症性自己免疫疾患(ERAP1の関与が指摘されている強直性脊椎炎や乾癬など)に対する治療の手段となりえる。また、血中ERAP1活性がこれら疾患における炎症増悪の新しいマーカーとして利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)： It has been known that ERAP1 mutation is associated with Behcet's disease. In this study, to elucidate the molecular mechanisms in the disease, roles of ERAP1 in inflammation were evaluated.

To construct a disease model, uveitis was induced by lipopolysaccharide(LPS) injection into peritoneal cavity of wild-type and ERAP1-knock out (KO) mice. Although nitric oxide (NO) in the blood was increased together with ERAP1 secretion therein after injection, ERAP1-KO caused the reduction of NO and Arg synthesis. These results suggest that secreted ERAP1 is involved in the NO synthesis via producing Arg. On the other hand, we found that secreted ERAP1 binds to exosome derived from activated macrophages and its complex lead to activation of naive macrophage mediating facilitation of Arg production, iNOS expression and phagocytosis.

Our data provide the evidence that free ERAP1 and ERAP1 associated with exosomes plays important roles in inflammation through macrophage activation.

研究分野：免疫学、生化学、細胞生物学

キーワード：アミノペプチダーゼ エキソソーム 一酸化窒素 炎症 ベーチェット病 貪食 LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

HLAクラスI分子によって提示される内在性の抗原ペプチドは小胞体内腔で小胞体アミノペプチダーゼ (ERAP1) 1 および 2 によって成熟化されることが知られている。申請者は最近、マクロファージにおいて ERAP1 が細菌やウイルス感染に伴い細胞外へと分泌され、酵素活性依存的にマクロファージの貪食活性を亢進することを明らかにした。従って、ERAP1 活性は獲得免疫と自然免疫の両方に対しても影響を及ぼす。近年、自己免疫疾患の一つであるベーチェット病に対するゲノムワイド関連解析が展開された結果、ベーチェット病の遺伝的要因として、いくつかの ERAP1 SNP が同定された。以上の結果から、変異に伴う ERAP1 の機能変化が抗原提示や免疫担当細胞の活性化に影響を及ぼし、上記疾患を誘発すると考えられる。

ベーチェット病は、外皮や神経、血管などにおいて慢性再発性の炎症を引き起こす疾患である。シルクロード病とも称される本疾患は、東アジアや地中海沿岸部に居住するモンゴロイドに多く認められる症例である。現在、発症の原因として HLA-B51 や A27 アリル、ERAP1 アリルを含む遺伝的要因や細菌・ウイルス感染などが関与することが明らかにされ始めてきたが、発症に至る詳細な分子機構については全く分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では ERAP1 の炎症反応誘導機構に焦点を当てた解析を展開することで、ERAP1 のベーチェット病への関与機構を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ERAP1 遺伝子欠損マウス血中における一酸化窒素濃度解析

ベーチェット病の代表的なモデルであるブドウ膜炎を惹起するべく、ERAP1 遺伝子欠損および野生型マウス (C57BL/6) の腹腔に大腸菌由来リポ多糖 (LPS) (10 mg/kg-weight) を投与した。投与 0、6、12、24 時間後の血液から血清を調製し、血清サンプル中の ERAP1 量、LAP 活性、一酸化窒素 (NO) 量、アミノ酸量をウエスタンブロットや、人工蛍光基質を用いた蛍光解析、Griess 法、MS 解析などによって定量解析した。

#### (2) ERAP1 結合エキソソームの機能解析

LPS およびインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) で活性化させたマクロファージ株 (RAW264.7) の培養上清から、超遠心 (100,000  $\times g$  24h) によりエキソソーム画分を分離した。得られたエキソソーム中に含まれる ERAP1 やその他のタンパク質をショットガンプロテオミクスやウエスタンブロット法により同定した。また、本エキソソームのマクロファージ活性化を NO 合成や貪食を指標に解析した。その際、遺伝子欠損や阻害剤処理などによりエキソソーム構成タンパク質の機能を抑制することで、エキソソーム作用に及ぼす影響を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 分泌 ERAP1 による炎症誘発機構

血清中の ERAP1 量を測定した結果、野生型マウスでは、刺激 6 時間後から ERAP1 の血中への分泌が確認された (図 1)。次に血清中の NO 量をその代謝産物 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> を指標に定量した。LPS 投与前は、両マウスの血中 NO 代謝物濃度に差異は認められなかったが、NO 代謝産物の濃度が最大 (約 200  $\mu$ M) となる LPS 投与 12 時間後では、ERAP1 遺伝子欠損マウスの血中 NO 濃度は野生型マウスの半分程度を示すことが明らかになった (図 2)。一方、LPS 投与 24 時間後には両マウスの血中 NO 代謝物濃度は投与前と同程度を示した。以上の結果から ERAP1 は、炎症性メディエーターとして知られる NO の合成に関与していることが示唆された。

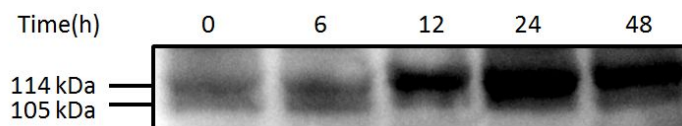


図 1. LPS 投与後の血中 ERAP1

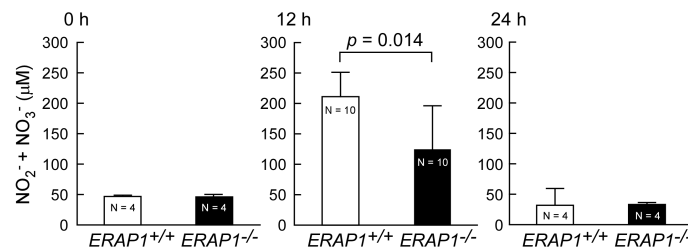


図 2. LPS 投与後の血中 NO 濃度

細胞外 Arg は、NO 合成の原料として利用されることが既に知られている。ERAP1 は、ペプチドから Arg を遊離させる酵素活性を有することから、血中においてペプチドから遊離 Arg を産生することで NO 産生に寄与する可能性が考えられる。そこで次に、血中 Arg 濃度について解析した。LPS 投与前および投与 12 時間後の野生型および ERAP1 遺伝子欠損マウスの血清 Arg 濃度 (100  $\mu$ M 前後) に差は認められなかった。しかしながら上述のように、12 時間後

の野生型マウスでは ERAP1 遺伝子欠損マウスに比べて NO 濃度が高いため、より多くの遊離 Arg が NO 合成に消費されたと考えられる。それらを考慮すると、潜在的な血中 Arg 量は、ERAP1 遺伝子欠損マウスより野生型マウスのほうが高いと考えられる。一方、NO 量が通常レベルに戻った投与 24 時間後の血清では、予想通り、野生型および ERAP1 遺伝子欠損マウスの Arg 濃度はそれぞれ約 170 および 120  $\mu\text{M}$  となった。

以上の結果をまとめると、分泌された ERAP1 は遊離 Arg 産生を介して NO 合成を亢進することで炎症を誘発・増悪させると考えられる。

## (2)ERAP1 結合エキソソームによるマクロファージ活性化

LPS と IFN- $\gamma$  で古典的活性化させた RAW264.7 の培養上清中からエキソソームを超遠心法により回収した後、そのエキソソームの成分を免疫電子顕微鏡法により解析した。その結果、本エキソソーム (AP(+)-exo) 中では非活性細胞から採取したエキソソーム (N-exo) にはない ERAP1 が存在することを見出した (図 3)。

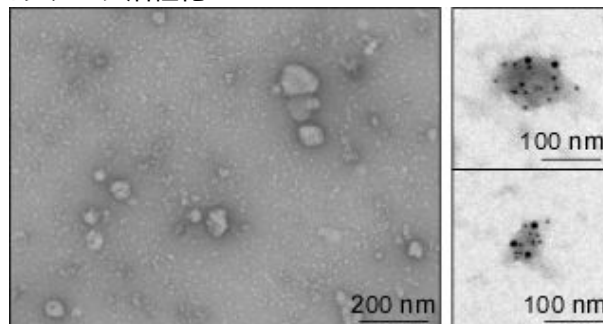


図 3 . AP(+)-exo の電子顕微鏡画像

左図 ; 透過像 , 右図 ; ERAP1 および Alix 染色像

次に、両エキソソームの構成成分をショットガンプロテオミクス解析やウエスタンブロット解析により比較した。その結果、AP(+)-exo にはサイトカイン (CCL3 や TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ) が含まれていることが分かった。これらの結果は、マクロファージが活性化に伴い、生体防御作用を有するエキソソームを分泌することを示唆している。

そこで、AP(+)-exo の生体防御活性 (マクロファージ活性化能) を解析した。RAW264.7 細胞における AP(+)-exo のオプソニン依存性貪食亢進活性は、N-exo や ERAP1 単独処理した場合に比べ 4-5 倍高いことが分かった。この貪食亢進は、エキソソーム中存在する ERAP1 と CCL3 によって引き起こされていることを遺伝子欠損や阻害剤を用いた解析から明らかにした。

また、AP(+)-exo は低濃度 (10 IU/mL) の IFN- $\beta$  でプライミングされた RAW264.7 細胞の iNOS 発現を誘導した。この iNOS 発現は TNF- $\alpha$  アンタゴニストと組換え型 IFNG 受容体の培地への添加によって大きく抑制されたことから、エキソソーム中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  は iNOS 発現誘導因子であることが示された。一方、エキソソームに結合した ERAP1 は iNOS 発現に影響を及ぼさなかったが、NO の原料である Arg 産生を介して NO 産生に寄与することが Arg 不含培地の利用や ERAP1 遺伝子欠損実験を介して明らかになった。

以上の結果をまとめると、古典的活性化マクロファージから分泌されるエキソソームには ERAP1 や CCL3、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  など生体防御関連分子が選択的に存在し、それらが協調的に作用することで貪食活性や NO 産生活性を協力的に亢進していることが明らかになった。したがって、この AP(+)-exo によるマクロファージの過剰な活性化が、パーチェット病の罹患に関与している可能性が考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Goto Yoshikuni, Nakamura J. Takahiro, Ogawa Kenji, Hattori Akira, Tsujimoto Masafumi, Acute-phase protein-like properties of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, Journal of Biochemistry, 査読有, 165 巻, 2019, 159-165

Goto Yoshikuni, Ogawa Yuko, Tsumoto Hiroki, Miura Yuri, Nakamura J. Takahiro, Ogawa Kenji, Akimoto Yoshihiro, Kawakami Hayato, Endo Tamao, Yanoshita Ryohei, Tsujimoto Masafumi, Contribution of the exosome-associated form of secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 to exosome-mediated macrophage activation, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 査読有, 1865 巻, 2018, 874-888

[学会発表] (計 7 件)

小島 雄太郎, 後藤 芳邦, 中村 孝博, 服部 明, 辻本雅文, パソプレシン分解酵素 P-LAP の脳内局在と概日リズム, 日本薬学会 第 139 年会, 2019 年

小林 春奈, 後藤 芳邦, 中村 孝博, 小川 健司, 服部 明, 辻本 雅文, 小胞体アミノペプチダーゼ 1 遺伝子欠損はセロトニン合成亢進を介して不安障害を惹起する, 日本薬学会 第 139 年会, 2019 年

金澤徹弥, 後藤芳邦, 中村孝博, 辻本雅文, ERAP1 遺伝子欠損マウスは精神障害マウスである -脳内セロトニン動態解析-, 第 62 回日本薬学会 関東支部大会, 2018 年

滝田万柚子, 後藤芳邦, 中村孝博, 辻本雅文, ERAP1 遺伝子欠損マウスは精神障害マウス

である -行動薬理学的解析-, 第 62 回日本薬学会 関東支部大会, 2018 年

後藤 芳邦, ERAP1 遺伝子欠損マウスは精神障害マウスである, 第 62 回日本薬学会 関東支部大会 (招待講演), 2018 年

後藤 芳邦, 小川 裕子, 津元 裕樹, 三浦 ゆり, 中村 孝博, 小川 健司, 服部 明, 秋元 義弘, 川上 速人, 遠藤 玉夫, 矢ノ下 良平, 辻本 雅文, ERAP1 結合型エキソソームによるマクロファージの古典的活性化, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017), 2017 年

後藤 芳邦, 小川 健司, 中村 孝博, 服部 明, 辻本 雅文, 小胞体アミノペプチダーゼはエンドトキシンショック時に惹起される一酸化窒素合成を亢進する, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016 年