

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08515

研究課題名(和文) アレスチン一酸化窒素修飾のケモカインシグナル調節機構と動脈硬化との関連について

研究課題名(英文) Regulation of chemokine signaling by post-translational modification of beta-arrestin and relationship with atherosclerosis

研究代表者

林 宏樹 (Hayashi, Hiroki)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：20813364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：7回膜貫通型受容体(G protein coupled receptor:GPCR)の重要なアダプター分子であるアレスチンは一酸化窒素による翻訳後修飾(S-ニトロシル化)を介してシグナルを調節している。今回動脈硬化病態において重要なケモカイン受容体CX3CR1シグナルに着目し、慢性炎症においてアレスチンのS-ニトロシル化がシグナルを調節し、動脈硬化発症機序に関連しているかどうかを検証した。その結果、アレスチンのS-ニトロシル化によってケモカインシグナルが調節されており、マクロファージのケモカインに対する遊走を増強することで動脈硬化発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで心不全において薬剤の重要なターゲットであるGPCR受容体シグナルはアレスチンの一酸化窒素翻訳後修飾によってシグナルが調節され病態に大きく関与することを見出している。今回、動脈硬化病態形成時に重要な役割が知られているCX3CR1ケモカイン受容体に着目し、同様にアレスチンの翻訳後修飾によってシグナル伝達が調節され、遊走活性など動脈硬化プロセスに関与しているかどうかを検討することで新規治療法や診断法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：beta-arrestin, known as an adaptor protein of G protein coupled receptors (GPCR), reported to regulate GPCR signaling via a post-translational modification, S-nitrosylation. We evaluated whether chemokine signaling, CX3CR1 receptor signaling, is modulated by S-nitrosylation of beta-arrestin, and whether S-nitrosylation-mediated signaling affects the pathology of atherosclerosis in this study. We found that S-nitrosylation of beta-arrestin biased chemokine signaling toward G-protein mediated signaling, versus beta-arrestin-mediated signaling, and that chemokine-induced macrophage migration was enhanced by S-nitrosylation of beta-arrestin. These results suggested that biased signaling of CX3CR1 by S-nitrosylation might regulate chemokine signaling, and affect pathogenesis of atherosclerosis by enhancement of macrophage migration.

研究分野：循環器基礎

キーワード：動脈硬化 翻訳後修飾 ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全や動脈硬化は慢性炎症を基盤とする疾患でありにおいて特異的に活性化されたり調節を受けるシグナル経路の解明は新規治療法、診断法の開発につながる。動脈硬化病変においては異常な脂質バランスと免疫反応によって引き起こされる慢性炎症病態を指し、単球およびマクロファージは病態形成において重要な役割を果たしていることが知られ(Moore K et al, *Nat Rev Immunol*, 2013) ケモカイン-ケモカイン受容体シグナルは単球の遊走や活性化マクロファージの増殖、アポトーシスなど多彩なシグナル活性化経路があり(van der Vorst EP et al, *J Mol Med*, 2015) これまでの報告においてCCR2、CCR5、CX3CR1はノックアウトマウスなどを使った解析などにより動脈硬化に大きく関与していることが報告されている(Barlic J et al, *Circulation*, 2006、Tache F, *J Clin Invest*, 2007、Tsou CL et al, *J Clin Invest*, 2007、Landsman L et al, *Blood*, 2009) これらケモカイン受容体はGタンパク共役型受容体(G protein coupled receptor; GPCR)であり、アレスチンによってその脱感作や内在化が調節される(Molteni R et al, *Blood*, 2009、Bennet LD et al, *Immunology*, 2011) ケモカインはこれまで約40種類のリガンドに対し、受容体が18種類ほどの存在が確認されており、最近、作用するリガンドによって受容体を介して活性化されるシグナル経路がバイアス化されることがわかり(Gタンパク経路シグナル vs アレスチン経路シグナル) 受容体の内在化、発現量

においても制御されていることがわかってきた。しかしながら、CX3CR1に関してはリガンドが唯一CX3CL1(Fractalkine)のみが知られており(Combadiere C et al, *Circulation*, 2003、Lesnik P et al, *J Clin Invest*, 2003、Rajagopal S et al, *J Biol Chem*, 2013、Bachelierie F et al, *Pharmacol Rev*, 2014、Steen A et al, *Front Immunol*, 2014、Zweemer AJM et al, *Trends Immunol*, 2014) シグナル経路、内在化調節機構の調節メカニズムなどについては知られていない(図1)

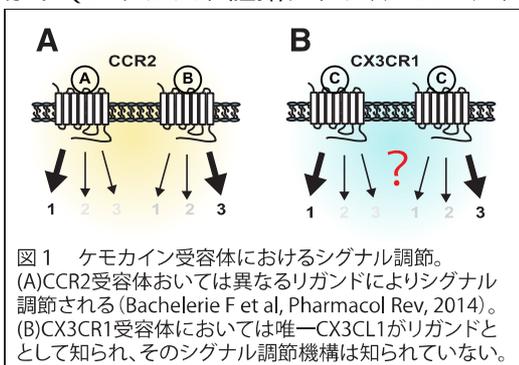


図1 ケモカイン受容体におけるシグナル調節。(A)CCR2受容体においては異なるリガンドによりシグナル調節される(Bachelierie F et al, *Pharmacol Rev*, 2014)。(B)CX3CR1受容体においては唯一CX3CL1がリガンドとして知られ、そのシグナル調節機構は知られていない。

Pharmacol Rev, 2014、Steen A et al, *Front Immunol*, 2014、Zweemer AJM et al, *Trends Immunol*, 2014) シグナル経路、内在化調節機構の調節メカニズムなどについては知られていない(図1)

S-ニトロシル化はタンパクのシステ

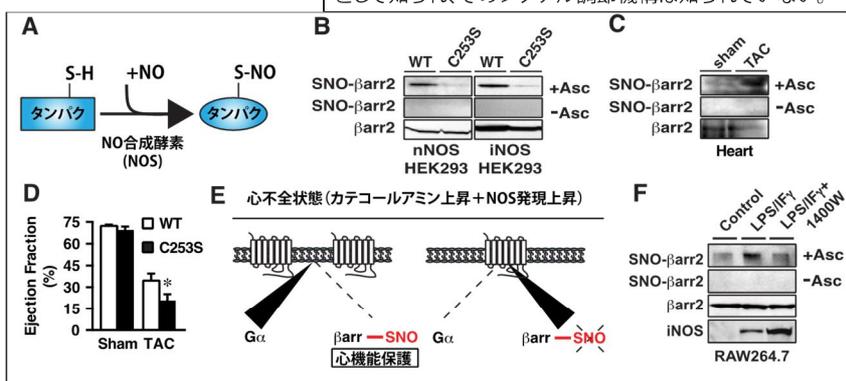


図2 S-ニトロシル化βアレスチン2は心不全において保護的役割を果たしている(Mol Cell, 2018)。(A)システイン残基のチオール基(S)がNO合成酵素によりS-ニトロシル化を受け、構造変化を介して機能が変化する。(B)βアレスチン2の253番目のシステイン残基がnNOSまたはiNOSによってS-ニトロシル化される。HEK293-nNOSまたはiNOS安定発現株にWT=野生型βアレスチン2、C253S=S-ニトロシル化を受けないセリン変異体βアレスチン2を強制発現させた。SNO-RACアッセイによりS-ニトロシル化を検出。(C)心臓負荷心不全モデル(TACモデル)においてS-ニトロシル化βアレスチン2レベルは上昇する。SNO-RACアッセイによりS-ニトロシル化を検出。(D)S-ニトロシル化されないC253S Knock-inマウスではTACモデルで心機能(Ejection Fraction)が悪化する。(E)心不全状態においてはβアレスチン2のS-ニトロシル化によってGタンパクシグナルにバイアスし心機能保護に働く。(F)活性化マクロファージにおいてiNOS依存的にβアレスチン2はS-ニトロシル化される。1400W=iNOS阻害剤。

ン残基が一酸化窒素(NO)によって修飾される翻訳後修飾として知られ、タンパクの構造変化を介して結合タンパクや局在に影響し、シグナル伝達に影響をもたらす。主要なNOの修飾酵素として一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase; NOS)が知られている(Hess

DT et al, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005)(図2A)。申請者のこれまでの検討において アレスチン2は炎症などにおいて発現が誘導される inducible NOS (iNOS)または neuronal NOS (nNOS)によってS-ニトロシル化されることを見出した(図2B)。心臓において アドレナリン受容体などの GPCR はポンプ作用など大変重要な機構を調節する受容体であり、アレスチンはその内在化、シグナル調整を調節している。心不全の病態において アレスチンの253番目のシステイン残基がS-ニトロシル化され、GPCR シグナルをバイアス化させることにより心機能保護に働いていることを見出した(図2C-E、Hayashi H et al, *Mol Cell*, 2018)。これまでの検討において活性化マクロファージ(RAW264.7)で アレスチン2が iNOS 依存的にS-ニトロシル化されること(図2F)。アレスチンのS-ニトロシル化によって GPCR シグナリング、内在化が調節されていることから動脈硬化病変において重要である CX3CR1 においても アレスチンの S-ニトロシル化によってシグナルをバイアス化させるメカニズムとして機能している可能性がある。動脈硬化モデルにおいて アレスチン2ノックアウトマウスは動脈硬化病変の改善が報告され(Kim J et al, *Cir Res*, 2008)。さらに動脈硬化部位に浸潤しているマクロファージで iNOS の発現上昇も認められている(Luoma JS et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998、Lukowicz TV et al, *Cardiovasc Res*, 2007)。これらより本研究においては アレスチン S-ニトロシル化とケモカイン受容体 CX3CR1 シグナル調節と動脈硬化病変形成プロセスとの関連性について研究する。

2. 研究の目的

これまで薬剤のターゲットの大半が GPCR であり、アゴニストまたはアンタゴニストが使用されてきたが、アレスチン依存的シグナルの発見とともにGタンパクシグナル、アレスチンシグナルの生理機能が明らかとなってきた(Hodavance SY et al, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017)。それらの知見を元にバイアスリガンド(Gタンパクシグナルまたはアレスチンシグナルどちらかを活性化させる)が着目され、これによって薬効や副作用が調節できる可能性があり、循環器領域を始め糖尿病、神経疾患、癌など様々な分野において研究が進められてきている。これまでの疾患モデルでの解析はノックアウトマウスを用いたものが多く、疾患におけるシグナル伝達変化(シグナルのバイアス化)などは検討されていないのが現状である。申請者のこれまでの検討において慢性炎症が関与する心不全モデルにおいて アレスチン2のS-ニトロシル化が GPCR シグナルのバイアス化を調節し、心機能に大きく影響していることを見出しており、動脈硬化においても病態に関わる主要な細胞であるマクロファージにおけるシグナルのバイアス化とその役割について検討し解明できれば、新たな治療ターゲットになりうる可能性が考えられる。

3. 研究の方法

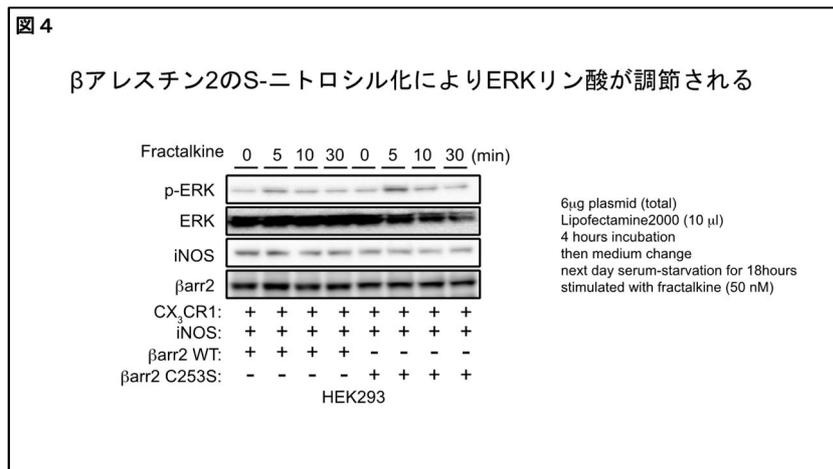
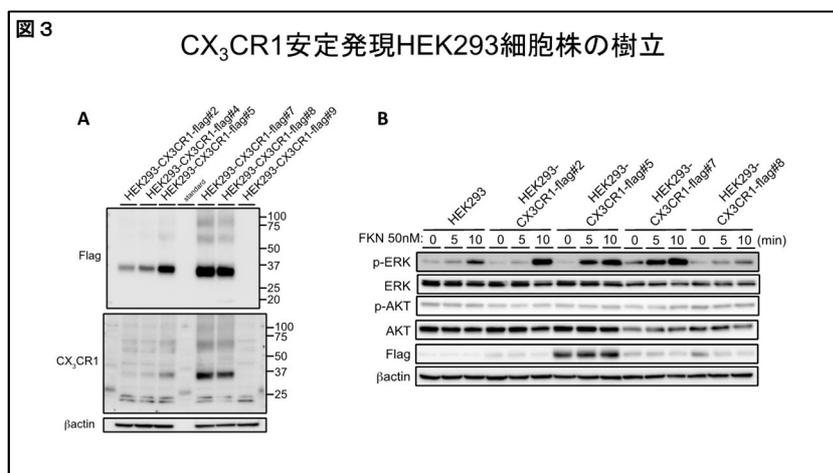
(1)S-ニトロシル化βアレスチン2のCX3CR1シグナル活性調節の検討。LPSなどで活性化したマクロファージにおいてシグナル伝達を評価することは難しいため、HEK293細胞

CX3CR1 安定発現株を樹立し、βアレスチン 2WT またはβアレスチン 2 の S-ニトロシル化されない変異株 (C253S) とともに iNOS を強制発現させてシグナルの検討を行う。Fractalkine(CX3CL1)で刺激後の G タンパク経路シグナル、またはβアレスチン 2 経路シグナル (ERK のリン酸化) を測定する。

(2) 単球系細胞 (マクロファージ) における S-ニトロシル化βアレスチン 2 の CX3CL1 の遊走活性への影響についての検討。単球系細胞である (RAW264.7 細胞) にβアレスチン 2WT またはβアレスチン 2 の S-ニトロシル化されない変異株 (C253S) とともに iNOS を強制発現させ、Fractalkine(CX3CL1)にて惹起される遊走活性を Boyden chamber アッセイにて評価する。

4 . 研究成果

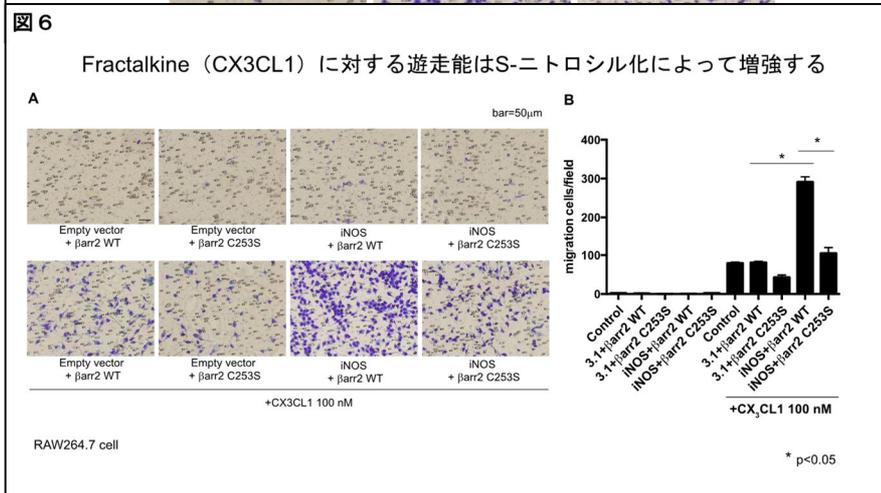
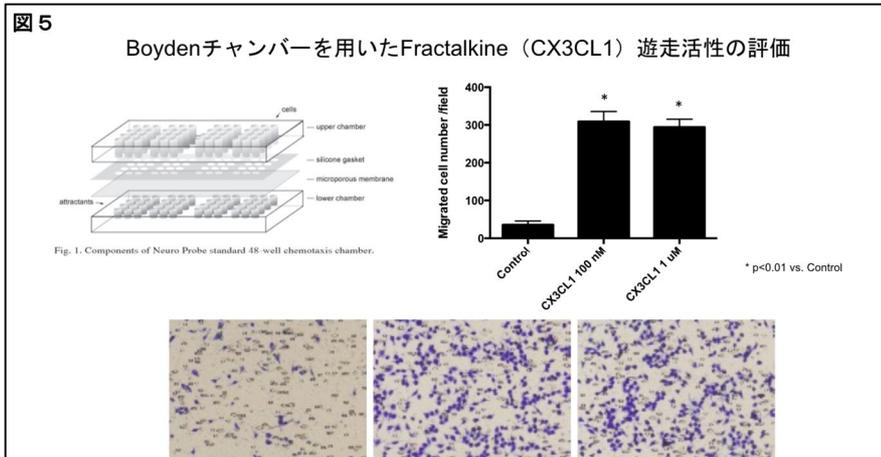
(1) S-ニトロシル化βアレスチン 2 の CX3CR1 シグナル活性調節の検討。まずシグナル伝達の評価において重要な HEK293-CX3CR1 安定発現株を作成した。pCMV6-mCX3CR1 プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクション、薬剤にてセクションした後、得られたクローンの受容体の発現量を Western blot にて確認し、リガンド (Fractalkine) 刺激を行い ERK のリン酸化を



確認してクローンの選定を行った。結果、Clone#5 が Flag (受容体) の発現また ERK シグナルを惹起しており、Clone#5 を次の実験に用いた (図 3)。HEK293-CX3CR1 細胞にβアレスチン 2WT またはβアレスチン 2 の S-ニトロシル化されない変異株 (C253S) とともに iNOS を強制発現させて、starvation 後に Fractalkine で刺激後タンパクを回収し、ERK のリン酸化を Western blot にて確認した。その結果、S-ニトロシル化されない変異型 アレスチン 2 を発現させた細胞では ERK リン酸化が増強していた (図 4)。これらより、アレスチン 2 の

S-ニトロシル化により受容体シグナルが調節されていることが示唆された。

(2) 単球系細胞 (マクロファージ) における S-ニトロシル化βアレチン2のCX3CL1の遊走活性への影響についての検討。RAW264.7細胞を用いてアレチン2のS-ニトロシル化のFractalkine (CX3CL1)の遊走能への影響をBoyden chamberアッセイを用いて検討した。まずFractalkineの濃



度を決定するために starvation 後の RAW264.7 細胞を Boyden チャンバーの upper チャンバーに入れ、lower チャンバーには 100nM または 1 μM の Fractalkine を入れて 37 度で 4 時間インキュベートし、upper チャンバーから lower チャンバー側に遊走している細胞を中間に挟んでいる microporous membrane の lower チャンバー側を染色して数をカウントした。その結果、100nM と 1 μM で差がなかったため (図 5) 100nM を次の実験に使用した。次に RAW264.7 細胞に野生型 アレチン2 または S-ニトロシル化されない変異型 アレチン2 と共に iNOS を強制発現させて Fractalkine に対する遊走活性を評価した。その結果、野生型 アレチン2 と iNOS を強制発現させた RAW264.7 細胞において遊走活性が増強することがわかった (図 6)。

これらの結果より、アレチン2のS-ニトロシル化よりCX3CR1シグナルが調節され、また遊走活性が増強することがわかった。iNOSの発現することが予測される慢性炎症状態において単球の遊走活性が増強され、動脈硬化病変の形成において強く関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroki Hayashi
2. 発表標題 Regulation of CX3CR1 Signaling and Function by NO-Mediated Post-Translational Modification
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Hayashi, Hironori Nakagami
2. 発表標題 Inflammation-associated NO regulates chemokine signaling via CX3CR1
3. 学会等名 The 3rd Asia Australia Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------