

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09950

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性の発症に関わるセリンプロテアーゼHtrA1の基質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of AMD related serine protease HtrA1

研究代表者

岡 千緒 (Oka, Chio)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30263445

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)：分泌型セリンプロテアーゼをコードするHtrA1遺伝子の多型は、高齢者の失明原因として重要な加齢黄斑変性(AMD)発症と強くリンクし、HtrA1の発現上昇を引き起こすが、そのメカニズムは不明である。我々は、HtrA1が分解するタンパク質、Clusterin(CLU)に注目し解析を行った結果、HtrA1はストレス下で凝集性CLUを分解もしくはリフォールディングし、細胞質に移行するCLUを増加させることによりオートファジーを促進しストレスに対する抵抗性を与える可能性を示した。今後は、何故HtrA1の過剰発現によるオートファジーの促進がAMDにつながるのかを解明する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMDは欧米において高齢者の失明原因の第1位、日本においても第3位であり、高齢化社会を迎えさらに増加すると考えられるが、根本的な治療が確立されていない。有効な治療法や予防法の確立のためにはAMDの病態形成メカニズムの解明が急務である。先行研究により、HtrA1プロテアーゼ活性の上昇がAMDの発症につながる事が強く示唆されているが、そのメカニズムは不明である。本成果は、HtrA1が基質タンパク質CLUを介して、オートファジーの促進に関与することをはじめ明らかなにしたものであり、HtrA1の異常によるAMDの病態形成メカニズムの理解に向けて一歩近づくものである。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness in the elderly. SNPs (Single nucleotide polymorphisms) of HtrA1 gene, which encodes a secreted serine protease, are strongly linked to the development of AMD and increase the HtrA1 expression level. We identified Clusterin (CLU) as a substrate of HtrA1 protease. It was reported that CLU transferred to the cytoplasm by ER-reflux and promoted autophagy under stress conditions. We found that HtrA1 enhanced autophagy and increased resistance to cell death by degrading or refolding of aggregated CLU and increasing the amount of CLU transferred to the cytoplasm under stress conditions. In the future, it is necessary to elucidate why enhancing of autophagy by HtrA1 leads to AMD.

研究分野：病態医化学

キーワード：加齢黄斑変性 HtrA1 オートファジー Clusterin 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの分泌型セリンプロテアーゼ HtrA (High temperature requirement A) 1 の発現や活性の異常は様々な病気と関連していることが報告されている。高齢者の失明の原因として重要な網膜変性疾患である加齢黄斑変性(Age-related Macular Degeneration : AMD)の発症と強いリンクを示す HtrA1 遺伝子の一塩基多型 (SNP)は HtrA1 遺伝子のプロモーター領域に位置し、HtrA1 の発現の上昇を引き起こしていると考えられる。しかし、AMD の病態を説明できる生理的な基質が同定されていないため、HtrA1 の発現異常がなぜ AMD を引き起こすか不明である。

(2) 我々は、野生型(WT)マウス、HtrA1 KO マウス、HtrA3 KO マウスおよび HtrA1/HtrA3 ダブルノックアウト (DKO) マウスの組織を材料にプロテオミクスの手法を用いて、基質の網羅的検索を行った。その結果、Clusterin (CLU) を含む数個の興味深い基質候補を得た。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では得られている基質候補蛋白質から基質として確からしい蛋白質を選択し、さらに HtrA1 による分解がどのような生理現象をもたらすかについて網膜組織をモデルとして解明するための解析対象を選択する。

(2) 基質として現時点で最も確からしい CLU についての機能解析を進める。CLU について基質としての確からしさを評価した結果、網膜で HtrA1 に特異的な基質である可能性が高まった。HtrA1 による CLU の分解が、網膜の生理現象にどのように関わっているか、またその破綻によりどのように AMD の病態が形成されるかを解明していく。

### 3. 研究の方法

(1) 得られている候補蛋白質が基質として確からしいかどうか評価する。HtrA1 KO、HtrA3 KO、HtrA1/HtrA3 DKO それぞれの遺伝型のマウスの大動脈、胎盤、網膜組織から蛋白を抽出し基質候補蛋白質に対する抗体でのイムノプロットにより KO マウスで蛋白の発現が増加しているかどうか、KO でのみ増加している特異的なバンドがあるか、RNA を抽出し候補蛋白質の mRNA レベルを qRT-PCR で解析し蛋白質レベルの増加が転写レベルの増加に因らないことを確認する。

(2) AMD の病態形成メカニズムにおいて基質蛋白質の機能を解析できる系を確立する。AMD は加齢に伴う RPE の機能低下に起因して発症すると考えられ、1. RPE の基底膜下にドレーゼンと呼ばれる沈着物が蓄積する、2. ドレーゼンは RPE に隣接する脈絡膜において新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) の形成を促す、3. CNV は異常な血管であることが多く出血しやすく失明に至る、ことによる。HtrA1 は網膜では RPE で高い発現が認められ、これらの一連の病態形成において HtrA1 の発現の増加は RPE 細胞内で、または分泌されて細胞外で HtrA1 が基質を分解することにより RPE の細胞死の増加、RPE の貪食機能の低下、脈絡膜にある血管内皮細胞の増殖能と遊走能の上昇、とそれによる脈絡膜血管新生の増加、脈絡膜組織での補体の活性化による炎症の増強、が引き起こされると考えられる。～ について解析可能な系を確立し、その系において CLU に対する HtrA1 の作用を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 基質候補蛋白質の一部については、HtrA1 ノックアウト (KO)、HtrA3 KO、HtrA1/HtrA3 DKO それぞれの遺伝型のマウスの大動脈、胎盤、網膜組織から蛋白を抽出し基質候補蛋白質に対する抗体でのイムノプロットにより KO マウスで蛋白の発現量を確認した。また、ヒト網膜色素細胞(RPE)株の ARPE19 細胞、HEK293T 細胞、Hela 細胞に野生型または、プロテアーゼ欠失変異型の HtrA1 の発現ベクターをトランスフェクションし、細胞溶解液および細胞上清について候補蛋白質に対する抗体を用いてイムノプロットしてヒトの細胞においても基質となりうるかを検証した。さらに、ARPE19 細胞、Hela 細胞において siRNA により HtrA1 のノックダウンの系を確立し、基質候補の発現量を検討した。その結果、神経変性疾

患において異常な凝集体を形成する、alpha-synuclein(ASNC)および網膜色素細胞 (RPE) の視細胞外節 (POS) の貪食に関わるタンパク質が興味深い動態を示したため、今後は解析対象として解析を進める。また、良い抗体が得られないため評価できなかった候補蛋白についても評価を進める。

(2) 基質として最も確からしいと考えられている CLU についての機能解析を進めた結果、HtrA1 が凝集した CLU を分解またはリフォールディングする可能性が考えられた。バクテリアの HtrA である DegP は熱変性タンパク質に対する分解活性とリフォールディング活性を持つ。哺乳類の HtrA 1 がリフォールディング活性を持つかどうかは現時点で明らかにされていない。HtrA1 KO マウスの網膜、腎臓では TritonX-100 に可溶性の CLU の量に差は無いが、難溶性の CLU が WT マウスに比べて増加しており HtrA1 が凝集した CLU を分解またはリフォールディングする可能性が示唆された。また、HtrA1 を過剰発現させた ARPE19 細胞、Hela 細胞では TritonX-100 に可溶性の CLU の量が増加し、難溶性の CLU が減少していた。

CLU は分泌されて働く細胞外シャペロンとして知られているが、酸化ストレスや ER ストレス下では ER から細胞質に移行し(ER-reflux)、オートファジーを促進する活性を持つことが報告されている。HtrA1 がストレスにより変性した CLU の分解またはリフォールディングすることで CLU の機能を介してオートファジーを促進するのではないかという可能性を検討した

(3) HtrA1 はオートファジーの進行に関与することが明らかとなった。

高齢の HtrA1 KO マウスの腎臓では、難溶性 p62、ユビキチン化タンパク質の量が増加しており、加齢に伴うオートファジーの低下が KO マウスで WT マウスに比べて著しいことが明らかとなった。

HtrA1 を過剰発現させた ARPE19 細胞および HeLa 細胞では、オートファゴソーム形成のマーカである LC3II と p62 の増加が認められ、オートファジーが亢進している可能性が示された。また、WT HtrA1 を過剰発現した ARPE19 細胞は酸化ストレスにより誘導される細胞死に対して抵抗性を示したが、オートファジー阻害剤 Bafilomycin 添加により抵抗性がキャンセルされた。

(4) AMD の病態形成メカニズムにおける基質蛋白質の機能を解析できる系を確立するために、Sodium Iodate (SI) 投与によりマウスに萎縮型 AMD の病態を誘導できる系を確立した。5 か月齢オスの WT マウスと HtrA1 KO マウスに 20mg/Kg 体重の SI を投与し、投与後 3 日目において網膜を神経網膜 (NR) と網膜色素上皮+脈絡叢 (RPE) に分けてタンパク質を抽出し、酸化ストレス (Nrf2、HO-1)、オートファジー (LC3B、p62)、細胞死 (Bax、Bcl2) について反応性の違いを検討した。その結果、NR および RPE において、WT に比べて KO では酸化ストレス応答性とオートファジー経路の活性化に障害があり、細胞死がより誘導されやすい状態にあることが明らかとなった。一方、高齢のマウス (10 か月齢) についても同様の解析を進めたところ、酸化ストレスに対する反応性 KO で高く、WT でより細胞死が誘導されやすい状態であり、5 か月齢マウスと逆の結果となった。この結果は、HtrA1 が酸化ストレスに対する抵抗性を与える一方で加齢に関しては促進的に働くという本研究室での先行研究と一致する。また、HtrA1 の基質タンパク CLU は、ストレス条件下では細胞質に移行し、オートファジーを促進することが報告されている。KO の RPE では SI 投与によって可溶性の CLU が減少しており、オートファジー経路の障害の一因である可能性が考えられた。さらに SI 投与によって不溶性画分の CLU は増加していたが、KO でより増加が顕著であった。不溶性の CLU の増加は、酸化ストレスにより変性し凝集したタンパク質とともに CLU が凝集していることを示しており、オートファジーによる凝集タンパク質の分解が不十分であることを示唆している。実際、不溶画分の p62 と Ub も KO の RPE で増加しており、オートファジーの進行に障害があり分解されていないと考えられた。

(5) HtrA1 が細胞外 CLU のシャペロン活性を阻害する。

CLU は細胞外シャペロン活性を持ちそのクライアントとなる変性タンパク質と結合すると細胞内に取り込まれ、変性タンパク質とともにリソソームで分解され、変性タンパク質の除去に働くことが報告されている (chaperon- and receptor-mediated extracellular protein degeneration)

(CRED))。CLU は AMD の発症の誘因となる沈着物であるドルーゼンの構成成分のうち主要なものとして報告されており、細胞外 CLU のシャペロン活性の低下がドルーゼンの形成に関与している可能性が考えられる。我々は CRED を定量的に検出できる系 (千葉大板倉先生より分与) において、HtrA1 の及ぼす影響を検討した。その結果、HtrA1 を過剰発現した ARPE19 細胞および HeLa 細胞では変性タンパク質と CLU の複合体の細胞内への取り込みが阻害されること、逆に HtrA1 KO MEF 細胞では WT MEF 細胞に比べ取り込みが促進されることが明らかとなった。またこの時、HtrA1 は変性タンパク質と結合していないフリーの CLU に対しては高い分解活性を持つが、変性タンパク質と複合体を形成した CLU に対しての分解活性は大きく低下した。CLU が細胞内に取り込まれる時同時に HtrA1 もとりこまれることから HtrA1 は CLU を分解できない形で CLU と複合体を形成し取り込みを阻害している可能性が考えられた。

HtrA1 による CLU 細胞外シャペロン活性の阻害は AMD におけるドルーゼンの形成を促進する可能性が考えられる。

本研究課題の研究成果を踏まえ、現時点における HtrA1 の CLU に対する作用、および AMD の病態形成における仮説を図 1 および図 2 に示す。今後の課題としては、HtrA1 が RPE の生理的機能として重要な POS の貪食機能にどのように関わっているかを明らかにする必要がある。また、HtrA1 の基質 CLU に対する活性が AMD の病態形成に実際に関わっているかを、AMD 罹患者から樹立した iPS 細胞を RPE 細胞に分化させた細胞や実際の臨床サンプルにおいて検証していく必要がある。

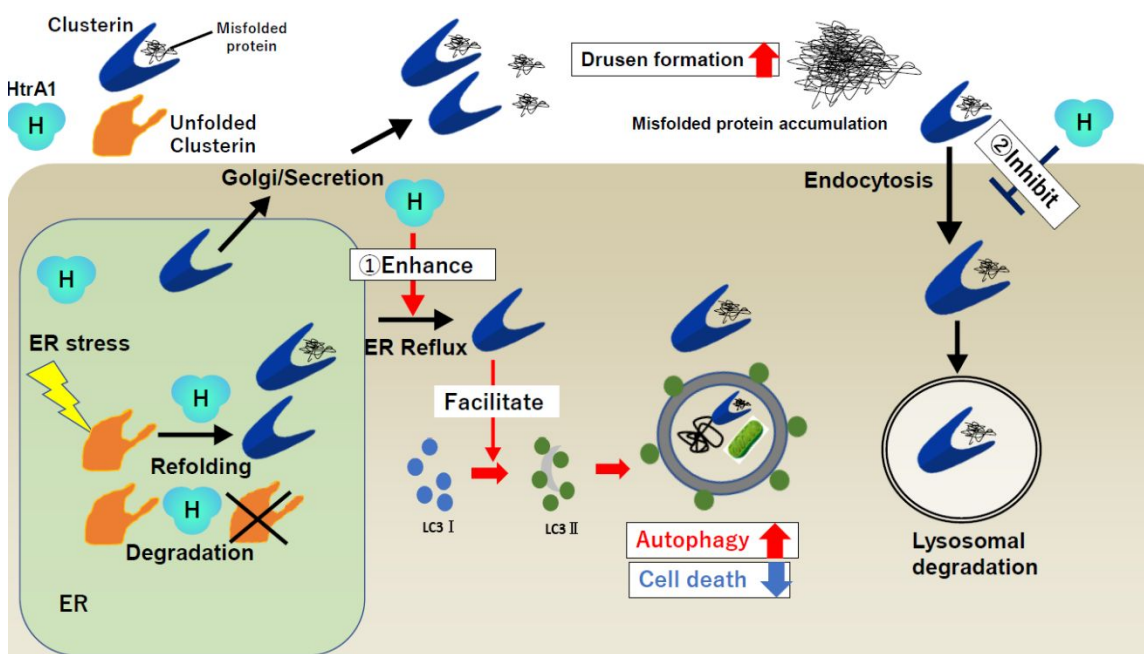


図 1 . AMD の病態形成における HtrA1 の細胞内 CLU および細胞外 CLU に及ぼす活性

HtrA1 は ER ストレスや酸化ストレスにより変性した CLU を分解またはリフォールディングする。それにより細胞質に移行する CLU の量が増加しオートファジーの促進に働くことで細胞死から細胞を守る。一方、細胞外 CLU に対してはシャペロン活性を阻害することにより細胞外の変性タンパク質の取り込みと分解を阻害しドルーゼンの形成を促進する可能性が考えられる。

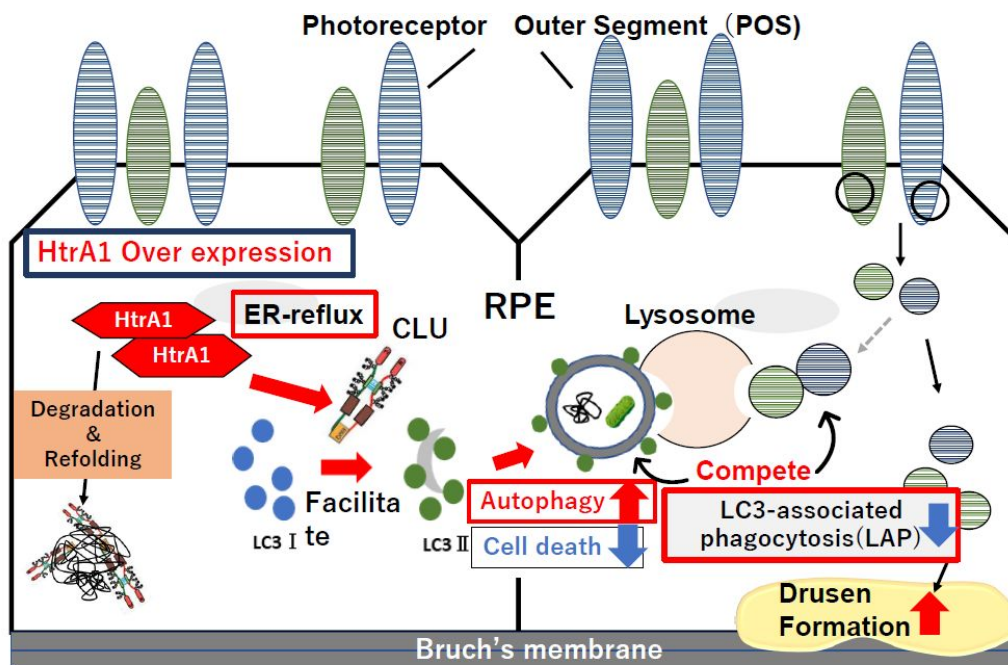


図2 . AMD 病態形成における HtrA1 によるオートファジーと LAP とのアンバランス

HtrA1 は ER ストレスや酸化ストレスにより変性した CLU を分解またはリフォールディングする。それにより細胞質に移行する CLU の量が増加しオートファジー促進に働く。しかし、RPE 細胞において重要な生理機能である POS の貪食機能は LC3-associated phagocytosis (LAP) という機構により担われておりオートファジーと LAP は共通のコンポーネントを多く使用するため互いに拮抗する機構であると考えられている。HtrA1 によるオートファジーの促進は一方で LAP に対して阻害的に働く可能性が考えられ、この二つの拮抗するメカニズムのアンバランスによりドレーゼンの形成を促進する可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Supanji Supanji, Perdamaian Ayudha Bahana Ilham, Romdhoniyyah Dewi Fathin, Sasongko Muhammad Bayu, Agni Angela Nurini, Wardhana Firman Setya, Widayanti Tri Wahyu, Prayogo Muhammad Eko, Oka Chio, Kawaichi Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of the HtrA1 rs11200638 Polymorphism with Neovascular Age-Related Macular Degeneration in Indonesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ophthalmology and Therapy	6. 最初と最後の頁 125 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40123-021-00402-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oka Chio, Kawaichi Masashi	4. 巻 138
2. 論文標題 HtrA1 meets NETs: does it open a new field?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 920 ~ 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021013025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sengking Jirakhamon, Oka Chio, Wicha Piyawadee, Yawoot Nuttapong, Tocharus Jiraporn, Chaichompoo Waraluck, Suksamrarn Apichart, Tocharus Chainarong	4. 巻 58
2. 論文標題 Neferine Protects Against Brain Damage in Permanent Cerebral Ischemic Rat Associated with Autophagy Suppression and AMPK/mTOR Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 6304 ~ 6315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-021-02554-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chio Oka, Razwa Saleh, Yasumasa Bessho, Hasan Mahmud Reza	4. 巻 29(4)
2. 論文標題 Interplay between HTRA1 and classical signalling pathways in organogenesis and diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Saudi Journal of Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 1919-1927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Supanji Supanji, Romdhoniyyah Dewi Fathin, Sasongko Muhammad Bayu, Agni Angela Nurini, Wardhana Firman Setya, Widayanti Tri Wahyu, Prayogo Muhammad Eko, Perdamaian Ayudha Bahana Ilham, Dianratri Aninditta, Kawaichi Masashi, Oka Chio	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Associations of ARMS2 and CFH Gene Polymorphisms with Neovascular Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1101~1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S298310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen PH, Tang T, Liu C, Wang B, Mian M, Oka C, Baquerizo M, Li Y, Xu L.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 High-Temperature Requirement A1 Protease as a Rate-Limiting Factor in the Development of Osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 18224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54807-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen PH, Tang T, Liu C, Wang B, Mian M, Oka C, Baquerizo M, Li Y, Xu L.	4. 巻 189(7)
2. 論文標題 High-Temperature Requirement A1 Protease as a Rate-Limiting Factor in the Development of Osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1423-1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.03.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡千緒
2. 発表標題 「HtrA1の病態生化学と創薬ターゲットとしての可能性」
3. 学会等名 日本病態プロテアーゼ学会、第24回学術集会シンポジウム (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------