

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790292

研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素 A20 のマウス個体における役割の研究

研究課題名（英文） Analysis of the role of deubiquitinating enzyme A20 using mouse model

研究代表者 稲垣 舞子 (INAGAKI MAIKO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：70543396

研究成果の概要（和文）：

本研究では、炎症反応を負に制御する脱ユビキチン化酵素 A20 の組織特異的ノックアウトマウスを作成した。腸上皮特異的ノックアウトマウスは目立った表現型を示さなかった。皮膚特異的ノックアウトマウスは生育遅延を起こした。解析の結果、皮膚には異常は認められなかったが、胃の食道側の上皮に炎症および肥厚化を認めた。このことから、A20 皮膚特異的ノックアウトマウスにおいては、胃において異所的に Cre が発現して A20 が欠損することによって炎症を起こし、その結果生育が遅延すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we generated tissue-specific A20 knockout mice. Intestine epithelium-specific A20 knockout mice did not show obvious phenotype. Skin-specific A20 knockout mice showed growth retardation after weaning. We have performed histological analysis, but we couldn't find any defect in A20 deficient skin. Instead, we found inflammation and hyperplasia on the non-glandular portions of the stomach. These data suggests A20 gene deletion in the non-glandular portions of the stomach of skin-specific A20 knockout mice, because of ectopic expression of cre. As a result, these mice might have stomach inflammation and growth reterdation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：炎症 がん

1. 研究開始当初の背景

細胞が微生物の侵入を感知すると、TLR (Toll Like Receptor) ファミリーに属する受容体が微生物由来の物質を感知し、炎症を誘導する細胞内シグナル伝達経路が活性化さ

れる。このシグナル伝達経路を介し、炎症性サイトカインである TNF や IL-1 が産生される。TNF や IL-1 により受容体が活性化されると、まず受容体に結合しているタンパク質が K63 型とよばれる、標的タンパク質の分

解を誘導しない型のユビキチン化を受けてユビキチン鎖を形成する。次に、シグナル伝達に関わる因子がリクルートされ、ユビキチン鎖を足場としたシグナル複合体が形成される。その結果、微生物の侵入した細胞の近辺で炎症に関わるサイトカインやケモカインの産生が上昇し、免疫細胞が微生物の侵入部位に浸潤する。

個体において、炎症反応は生体を微生物の侵入から守り、生体機能を維持するために必要な応答であるが、過剰な炎症や持続的な炎症は組織に損傷を与え、様々な疾患の原因ともなりうる。このため、生体には炎症反応を負に制御する機構が存在している。そのような機構の一つとして、タンパク質の脱ユビキチン化があげられる。TLRファミリーに属する受容体やTNF受容体に結合したタンパク質が脱ユビキチン化酵素によって脱ユビキチン化されることにより、下流のシグナル複合体が解離し、最終的に炎症反応が終了すると考えられている。この機構の異常は、過剰な炎症や持続的な炎症によって引き起こされる病気、例えばリウマチや慢性腸炎、クローン病などの原因となる。また、慢性炎症はがんの発症および進行と深く関連していることも示唆されている。したがって、炎症反応を負に制御する機構の解明は、これらの病気の治療法を開発する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

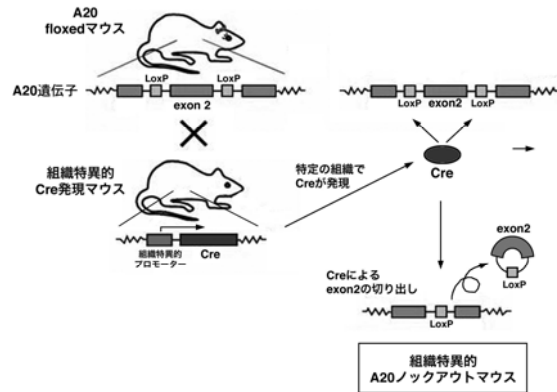
A20は、最初TNF刺激によって発現が上昇する因子として単離された。その後の研究により、A20は脱ユビキチン化酵素として働いており、TLRやTNFレセプターの結合因子に結合しているK63型のユビキチン鎖を分解することによって、炎症を誘導する細胞内シグナル伝達経路を負に制御していることが明らかとなった。実際、A20遺伝子を欠損した細胞ではTLRやTNFシグナルの遷延が見られることが報告されている。近年、リウマチや全身性エリテマトーデスの患者においてA20の変異が起こっているという報告もあり、A20の生体における役割解明の重要性が近年ますます高まってきている。

A20のノックアウトマウスは、肝臓や腸上皮など多臓器に炎症を起こして生後数週間ではほとんどが死亡する。マウスを用いた遺伝学的解析から、この炎症は主にTLRシグナルの遷延が原因であることがわかっているが、組織レベルでのA20の役割解析はこれまでほとんど為されてこなかった。本研究は、Cre-LoxPシステムを用いたA20遺伝子の組織特異的ノックアウトマウスを作製して解析することにより、炎症反応制御、および慢性炎症とがん形成との関わりについての分子メカニズムを生体レベルで解明すること

を目的として行った。

3. 研究の方法

まず、二番目のエクソンが二つのLoxP配列で挟まれているA20遺伝子をもつマウス(A20 floxed マウス)を作成した。次に、A20 floxed マウスを、皮膚特異的に発現する遺伝子であるKeratin 5のプロモーター支配下でCreを発現するマウス(K5-Cre マウス)または腸上皮特異的に発現する遺伝子であるVillinのプロモーター支配下でCreを発現するマウス(Villin-Cre マウス)と交配することにより、皮膚特異的A20ノックアウトマウス、および腸上皮特異的ノックアウトマウスを作製し、観察を行った。また、それらのマウスから組織を単離して組織切片を作成し、形態学的解析を行った。



4. 研究成果

A20の腸上皮特異的ノックアウトマウスは正常に生育し、炎症等の表現型も示さなかった。A20皮膚特異的ノックアウトマウスは正常に生まれてくるが、離乳後の生育が野生型と比べて著しく悪かった(図1)。A20を欠損させた組織をマウスから単離して組織切片を作製し、表現型を形態学的に解析したところ、皮膚組織には顕著な異常はみられなかったが、手足指に激しい炎症が認められた。さらに詳しく解析を行ったところ、胃の食道側の部位に激しい炎症および肥厚化が認められた(図2)。

マウスにおいては、胃の食道側は角化扁平上皮で覆われていることが知られている。A20皮膚特異的ノックアウトマウスにおいてはKeratin 5のプロモーター支配下でCreを発現させているため、おそらく胃においてもCre遺伝子が発現しており、結果としてA20が欠損しているのではないかと考えられる。また、その結果として胃に炎症が起き、食物の消化吸収が阻害されることが原因で生育不全が起こっているものと考えられる。

皮膚に炎症が起きず、手足指と胃に炎症が

限局する原因については不明であるが、離乳前は生育に差がないことから、物理的刺激の多寡が原因のひとつとして考えられる。離乳後は固形餌を摂取するため、母乳に比べて組織に対する物理的刺激が強いと考えられる。手足指についても、体幹の皮膚組織に比べて運動量が多いことから、やはり物理的に負荷がかかっていると考えられる。これらの点については今後検討していく予定である。

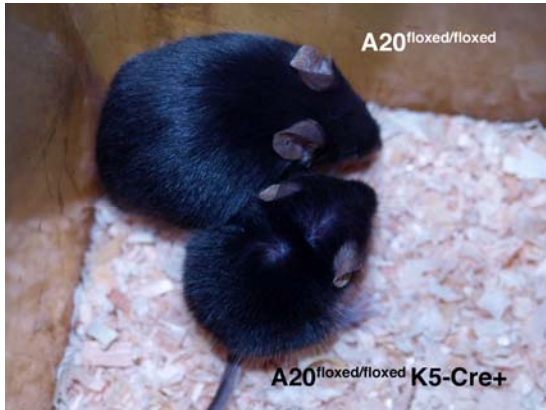


図1 皮膚特異的 A20 ノックアウトマウスは生育遅延を起こす
(上:野生型マウス 下:皮膚特異的 A20 ノックアウトマウス)

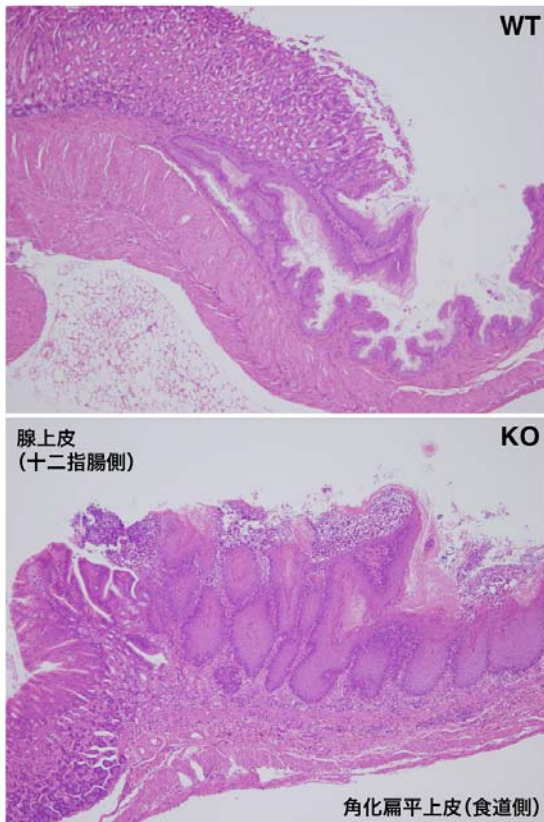


図2 皮膚特異的 A20 ノックアウトマウスは胃の角化扁平上皮に炎症を起こす

(上:野生型 下:A20 ノックアウトマウス)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Takaesu G, Inagaki M, Takubo K, Mishina Y, Hess PR, Dean GA, Yoshimura A, Matsumoto K, Suda T, Ninomiya-Tsuji J.

TAK1 (MAP3K7) signaling regulates hematopoietic stem cells through TNF-dependent and -independent mechanisms.

PLoS One. 2012;7(11):e51073

doi: 10.1371/journal.pone.0051073

査読あり

2. Morioka S, Inagaki M, Komatsu Y, Mishina Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J.

TAK1 kinase signaling regulates embryonic angiogenesis by modulating endothelial cell survival and migration.

Blood. 2012;120(18):3846-57

doi: 10.1182/blood-2012-03-416198

査読あり

3. Omori E, Inagaki M, Mishina Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J.

Epithelial transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) is activated through two independent mechanisms and regulates reactive oxygen species.

Proc. Natl. Acad. Sci. 2012;109(9):3365-70

doi: 10.1073/pnas.1116188109

査読あり

4. Lachke SA, Higgins AW, Inagaki M, Saadi I, Xi Q, Long M, Quade BJ, Talkowski ME, Gusella JF, Fujimoto A, Robinson ML, Yang Y, Duong QT, Shapira I, Motro B, Miyoshi J, Takai Y, Morton CC, Maas RL.

The cell adhesion gene PVRL3 is associated with congenital ocular defects.

Hum. Genet. 2012;131(2):235-50.

doi: 10.1007/s00439-011-1064-z

査読あり

[学会発表] (計 1 件)

1. Inagaki M, Koyama H, Kikuchi A, Hiroaki H.

Loss of Wnt5a in hematopoietic cells exacerbates Chronic Myelogenous Leukemia induced by p210BCR/ABL fusion protein.

The 69th Annual Meeting of the Japanese

Cancer Association
Sep. 22-24 2010, Osaka, Japan.

[その他]
ホームページ等

広島大学 原爆放射線医科学研究所
疾患モデル解析分野ホームページ
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sosai/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 舞子 (INAGAKI MAIKO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：70543396

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：