

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590365

研究課題名(和文)慢性炎症病態への小胞体ストレス経路の時空間的関与機構の解析

研究課題名(英文)Involvement of ER stress pathway in chronic inflammatory diseases.

## 研究代表者

後藤 知己(GOTOH, TOMOMI)

熊本大学・教育学部・教授

研究者番号：20264286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内ストレスセンサー系である小胞体ストレス応答経路が、転写因子CHOPの誘導を介して、これまで我々が明らかにした急性冠症候群の発症だけでなく、その後の心臓の虚血再灌流障害に関与しており、とくに活性酸素の誘導が小胞体ストレス経路の誘導に重要である事を明らかにした。また、膝関節症における軟骨組織障害にも小胞体ストレス-CHOP経路が関与している事を明らかにした。次に、ゴルジ体-細胞膜における脂質異常が小胞体など他の細胞内小器官に影響を与える機序をSMS1ノックアウトマウスをモデルに解析するとともに、欠損によりミトコンドリアストレスを誘導する可能性のある新規タンパク質の構造機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that ER stress-CHOP pathway is involved in the formation of atherosclerosis, especially in plaque instability. In this study, we clarified that ER stress-CHOP pathway is involved in the myocardial re-perfusion injury. In this model, we also showed that oxygen radical is involved in the activation of ER stress-CHOP pathway. Treatment with oxygen radical scavenger rescued re-perfusion injury. We also showed that damage of cartilage tissue in OA is mediated by ER stress pathway. Next, we clarified that abnormality of lipid species in ER-Golgi-cell membrane compartment influences mitochondrial function, using SMS1-knock out mice. Recently, it is reported that each organelle stress influence other organelle functions. Therefore, we analyzed a novel putative mitochondrial molecule to clarify the influences on ER in mitochondrial stress. We clarify that putative mitochondrial diseases-related molecule TMEM65 is a mitochondrial inner-membrane protein.

研究分野：病態生化学

キーワード：小胞体 細胞小器官 ストレス応答 アポトーシス ミトコンドリア 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成・成熟の場であるが、合成後には、一部の切断、折りたたみによる立体構造の形成、糖鎖の付加などの複雑な課程が行われる。この複雑な過程が常に行われているため、小胞体は細胞内外からの様々なストレスの影響を受け、しばしば機能障害をおこす。この機能障害は、小胞体内での構造異常タンパク質の蓄積を招き、そのために、ますます小胞体機能が障害され、やがては細胞全体に悪影響を及ぼし、細胞そのものの生存を危うくする。これに対して、細胞は、小胞体内での構造異常タンパク質の蓄積をモニターし、それに対して対応するための機構として小胞体ストレス経路を発達させている。その原型は、既に酵母において認められるが、ほ乳類においては高度に発達し、小胞体膜上に存在する3種類の小胞体ストレスセンサーにより、構造異常タンパク質の蓄積を感知すると、センサーが活性化され、細胞内に様々なシグナルが送られる。その結果、小胞体シャペロン分子の誘導等により、小胞体内のシャペロン活性を増加させ、構造異常タンパク質のフォールディングを助けたり、ERADを介する分解を促進することにより、小胞体機構を改善・維持しようとする。しかし、小胞体機構の低下が重度の場合には、アポトーシス経路が誘導され、細胞全体が処理され、周囲の細胞・組織への悪影響が回避される。これまでの研究から、小胞体ストレスセンサーの活性化機構については、詳細な分子機構が明らかにされてきた。我々は、小胞体ストレスセンサーからのシグナルにより誘導されるストレス応答経路、とくにアポトーシスに至る経路の解明に中心的に取り組み、三種類の小胞体ストレスセンサーいずれからのシグナルも受けて誘導される転写因子である CHOP が、小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおいて中心的な機能を果たしていることを明らかにしてきた。(図1) また、CHOP の下流では、pro-apoptotic な Bcl-2 ファミリー分子である Bax の活性化とミトコンドリアへの移行が、アポトーシスシグナルを伝達し、ミトコンドリアからのシトクローム c の流出を介して、caspase3 を活性化し、細胞がアポトーシスに至る事を明らかにした。(図2、図2では、小胞体ストレス応答において CHOP と平衡して働いて考えられている ASK1-JNK/p38 経路も記載) また、LPS 刺激による炎症誘導の場合には CHOP 誘導が、IL-1beta の分泌を刺激し、炎症反応を誘導す

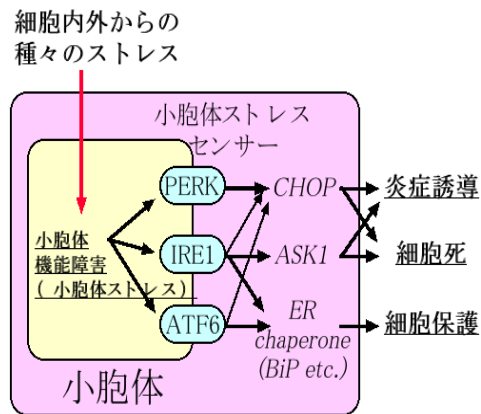


図1 小胞体ストレス応答経路の概略

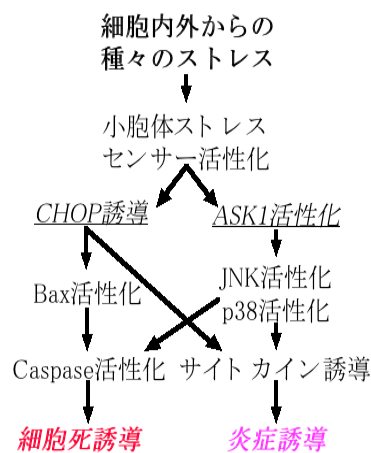


図2 CHOPとASK1の経路の概略

る事も報告している。しかし、小胞体ストレス経路が関与する様々な疾患では、小胞体ストレスセンサーの活性化や、小胞体シャペロン分子群の誘導は報告されているものに、その病態は様々であり、小胞体ストレス応答が炎症誘導、細胞死、細胞保護など様々な機能を果たしていることが我々を含む多くの研究室から報告されている (図1)。しかし、小胞体ストレスセンサー活性化後のシグナル伝達経路の違い、核やミトコンドリア等の他の細胞内小器官の関与にどのような差があり、その結果、どのような分子機構の差が病態の差につながっているのかは、未解明の部分が大きかった。また、我々が提唱した細胞内ストレスセンサーとしての小胞体だけでなく、核、ミトコンドリア、ゴルジ体といった他の細胞内小器官がセンサーとして機能するストレス応答系が存在することが明らかにされつつあるが、その中で、小胞体がどのような役割を果たしているのかについても、未解明であった。

## 2. 研究の目的

慢性炎症が、いわゆる炎症性の疾患だけでなく代謝性疾患、循環器疾患、癌、変性疾患など様々な疾患の基盤病態として機能している事が近年明らかにされてきている。それらの疾患において、転写因子 CHOP を含む小胞体ストレス応答関連分子群の誘導の報告は多くなされているが、その意義については必ずしも明らかではなかった。そこで、本研究では、いくつかの疾患のモデルを作製し、CHOP を中心とした小胞体ストレス関連分子群の関与について解析を行った。

また、ミトコンドリアやゴルジ体由来するストレスが、どのような機構で小胞体に影響を及ぼし、その結果誘導されるストレス応答経路において小胞体ストレス関連分子がどのように関与するのか、を明らかにするために、そのモデル系となる病態モデルの作成、解析も行った。

## 3. 研究の方法

- ①動脈硬化形成およびプラークの不安定化において、コレステロール蓄積が中心的な誘因となった小胞体ストレス-CHOP 経路が重要な働きをしていることは既に報告していた。今回、心筋梗塞病態を悪化させる冠動脈の再灌流障害における小胞体ストレス-CHOP 経路の関与を明らかにするために、野生型ならびに CHOP ノックアウトマウスにおいてモデル病態を作製し、解析した。
- ②膝関節症は高齢化社会の到来とともに患者数が増加し続けている疾患で、社会的な影響は極めて大きい。関節軟骨は再生しないと考えられており、その病態の解明、進展阻止の方法の解明は極めて意義が深い。しかし、未だ十分に解明されたとは言いがたいのが現状である。そこで、この慢性の疾患における小胞体ストレス-CHOP 経路の関与を明らかにし、治療標的となりうる可能性について解析を行った。
- ③細胞膜の構成分子は、小胞体—ゴルジ体において産生され、膜輸送により細胞膜に運搬される。そのため、この経路に関与する分子の異常は、小胞体—ゴルジ体—細胞膜の様々な機能障害、ストレスとなる。細胞膜の主要構成脂質の一つであるスフィンゴミエリンの合成酵素を欠損したマウスをモデルに小胞体、ゴルジ体、さらにはミトコンドリアを含んだストレス応答系を解析し、細胞内小器官のストレス応答連関を明らかにすることを試みた。
- ④ミトコンドリアは、種々の原因におけるア

ポトーシスにおいて、シグナルが伝達され、アポトーシス誘導における pointt-of-return の役割を果たしている。しかし、近年、明らかになりつつある、所謂ミトコンドリアストレスにおける細胞内小器官の連携機構に付いては、不明の点が多い。そこで、ミトコンドリアの機能障害をおこす代謝異常マウス、および、ミトコンドリア病との関連が疑われる分子について解析を行い、小胞体との関わりについて明らかにすることを試みた。

## 4. 研究成果

①心筋の虚血再還流モデルを左冠状動脈を50分間血流を止めた後、血流を再開することにより作成した。その後、再還流障害が認められた心筋領域では、小胞体ストレス誘導性転写因子CHOPをはじめとする小胞体ストレス関連分子の誘導が認められた。また、この領域にはTNFa、IL1、IL6などの炎症性サイトカインの誘導も認められた。ところが、CHOP ノックアウトマウスでは、炎症性サイトカイン誘導の抑制ならびに再還流障害領域の縮小が認められた。このことから、再還流障害領域においては、小胞体ストレス-CHOP経路の誘導が、慢性炎症さらには心筋細胞死の誘導に重要な働きをしていると考えられた。(図3) さらに、小胞体ストレス経路がどのような機構で誘導されているかを明らかにするため、フリーラジカル消去剤であるエダラボンを血流途絶の前に投与し、その効果を検証した。その結果、投与したエダラボンの容量依存的にCHOPの誘導は抑制され、小胞体ストレス—CHOP経路の誘導に再還流による活性酸素の産生が関与していると考えられた。CHOPは心筋梗塞病態の治療標的となる可能性があると考えられる。

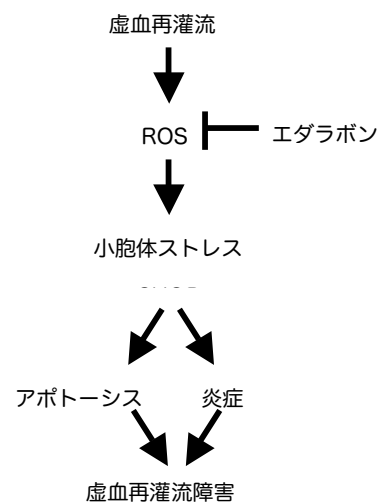


図3 虚血再灌流障害と小胞体ストレス

②膝関節症(OA)を呈するヒト膝軟骨においてCHOPなどの小胞体ストレス関連分子の誘導を認め、OA病態に小胞体ストレスが関与している可能性が高い事を明らかにした。小胞体ストレス誘導の程度はOAの重症度に比例していた。さらに培養ヒト軟骨細胞を使用し、小胞体ストレス経路の誘導が軟骨細胞の細胞死を誘導することを証明した。これらの結果より、OAにおける軟骨障害の発症に小胞体ストレス経路が関与し、CHOPなどの小胞体ストレス誘導性細胞死に関与する分子群がOAの治療標的となりうる可能性が示された。

③小胞体—ゴルジ体系の膜のスフィンゴミエリン脂質異常を呈するマウス(SMSノックアウトマウス)をモデルに、ミトコンドリア機能への影響の伝達機構、小胞体ストレス関連分子の動態について検討した。その結果、ミトコンドリア内膜の電子伝達系の異常がATP産生を障害するとともに、活性酸素産生を亢進させている事が明らかとなり、その結果としての細胞障害には小胞体ストレスの関与が示唆された。個体レベルでは、脂質代謝への障害も認められ、その機序を解析中である。

④ミトコンドリア機能異常が引き金を引いたストレス応答において、小胞体ストレス経路がどのような役割を果たすのかを明らかにするために、まずミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア機能の維持に関与する可能性のあるタンパク質として、解析の進んでいないTransmembrane protein65 (TMEM65)に注目し、構造機能解析を行った。TMEM65は、ミトコンドリアにおいて転写後のタンパク質合成の過程に関与し、ある種のミトコンドリア病に関与していると考えられているsteroid receptor RNA activator (SRA)の下流に位置し、ミトコンドリアタンパク質である可能性が高いとされていた分子である。TMEM65をほ乳類細胞においてノックダウンしたところ、細胞の酸素消費速度および解糖系に影響を与えた。また、TMEM65がミトコンドリアの内膜タンパク質であることを証明し、アミノ酸配列から、そのトポロジーを推定した。(図4)今後、TMEM65欠損の各細胞内小器官への影響を解析する予定である。

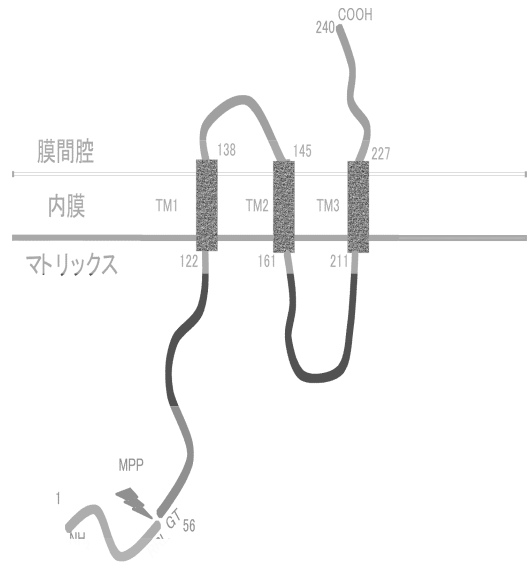


図4 TMEM65はミトコンドリア内膜タンパク質である

## 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 8 件)

1. Y. Miyazaki, K. Kaikita, M. Endo, E. Horio, M. Miura, K. Tsujita, S. Hokimoto, M. Yamamoto, T. Iwawaki, T. Gotoh, H. Ogawa & Y. Oike. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 31: 1124-1132 (2011) (査読有り)
2. M. Yano, K. Watanabe, T. Yamamoto, K. Ikeda, T. Senokuchi, M. Lu, T. Kadomatsu, H. Tsukano, M. Ikawa, M. Okabe, S. Yamaoka, T. Okazaki, H. Umehara, T. Gotoh, W.J. Song, K. Node, R. Taguchi, K. Yamagata & Y. Oike. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice.

- J. Biol. Chem.** 286: 3992-4002 (2011) (査読有り)
3. K. Takada, J. Hirose, K. Senda, S. Yamabe, Y. Oike, T. Gotoh & H. Mizuta. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage. **Int. J. Exp. Pathol.** 92: 232-242 (2011) (査読有り)
4. T. Gotoh, M. Endo & Y. Oike. Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases. **Int. J. Inflamm.**, 2011: 1-8 (2011) (査読有り)
5. N. Shaabani, N. Honke, P.A. Lang, B. Gorg, P. Proksch, N. Gailus, T. Gotoh, D. Haussinger, K.S. Lang. Tunicamycin inhibits diabetes. **Cell Physiol. Biochem.** 29: 595-602 (2012) (査読有り)
6. M. Maris, L. Overbergh, C. Gysemans, A. Waget, A.K. Cardozo, E. Verdrengh, J.P. Cunha, T. Gotoh, M. Cnop, D.L. Eizirik, R. Burcelin, C. Mathieu. Deletion of C/EBP homologous protein (Chop) in C57Bl/6 mice dissociates obesity from insulin resistance. **Diabetologia.** 55: 1167-1178 (2012) (査読有り)
7. M. Yano, T. Yamamoto, N. Nishimuras, T. Gotoh, K. Watanabe, K. Ikeda, Y. Garan, R. Taguchi, K. Node, T. Okazaki, Y. Oike. Increased oxidative stress impairs adipose tissue function in sphingomyeline synthase I null mice. **PLoS One.** 2013 12;8(4):e61380. doi:10.1371/journal.pone.0061380. Print 2013 pp.1-12. (査読有り)
8. N. Nishimura, T. Gotoh, Y. Oike & M. Yano. TMEM65 is a mitochondrial inner-membrane protein. **PeerJ.** 2014 349 doi: 10.7717 (査読有り)
- [学会発表] (計 3件)
1. 後藤知己、東野寛人、宮崎勇次、宮田敬士、田爪宏和、矢野正人、遠藤元蒼、尾池雄一  
一般演題「循環器病態における小胞体ストレス-CHOP 経路の関与」第 6 回臨床ストレス応答学会大会 (名古屋大学病院) 2011 年 11 月 4 日
2. 後藤知己、矢野正人、遠藤元蒼、尾池雄一  
シンポジウム (小胞体ストレスと活性酸素ストレスのクロストーク): 「感染病態における NO 誘導性小胞体ストレス-CHOP 経路の役割」第 12 回日本 NO 学会学術集会 (神戸国際会議場) 2012 年 6 月 29 日
3. 後藤知己、宮崎勇次、矢野正人、遠藤元蒼、尾池雄一  
シンポジウム (敗血症における全身性炎症と細胞死): 「虚血再灌流障害への小胞体ストレス-CHOP 経路の関与」第 21 回日本 Cell Death 学会学術集会 (名古屋大学病院) 2012 年 7 月 27 日
- [図書] (計 0件)
- [産業財産権]  
○出願状況 (計 0件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等  
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 知己 (GOTOH, Tomomi)  
熊本大学・教育学部・教授  
研究者番号：20264286

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：90312321

遠藤 元誉 (ENDO, Motoyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：40398243