

令和元年6月3日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09922

研究課題名(和文) プロテアソームの機能異常による自己炎症病態誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of autoinflammatory disorder induction due to proteasome dysfunction

研究代表者

佐々木 由紀 (SASAKI, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：50454757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：進行性の部分脂肪萎縮を呈する自己炎症症候群JASLの原因遺伝子として免疫プロテアソームサブユニットPSMB8ミスセンス変異が同定されている。その病態を解明するために患者と同様の変異を持つPsmb8変異ノックインマウス(Psmb8-KI)を樹立、解析した。イミキモド塗布皮膚炎誘導モデルでは、Psmb8-KIは野生型より炎症が早期発症かつ増悪し炎症性サイトカイン遺伝子発現増強が見られた。また各サイトカイン阻害抗体投与によって炎症は軽減するが、なおもPsmb8-KIの方が重症であった。炎症部位にてX遺伝子発現増強が見出され、X関連経路阻害剤投与によってPsmb8-KIと野生型の炎症の差がなくなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSMB8のミスセンス変異は、JASLと同様の臨床症状を呈する中條・西村症候群などでも見いだされ、近年これらの症候群はプロテアソーム関連自己炎症症候群(PRAAS)と呼称されPSMB8以外のサブユニットの変異も報告されている。しかしPRAASの詳しい発症機構は解明されていない。ヒトと同じ変異を持つPsmb8-KIマウスを樹立し解析を行った結果、本研究では免疫プロテアソームの機能破綻がどのように炎症病態を誘導しているかについての分子機構の一端を明らかにした。今後PSMB8が様々な炎症病態にどのように機能しているかを解明することは慢性炎症性疾患に対する治療法の開発に大きく貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The mutation in PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy due to low activity of immunoproteasomes in human. The molecular basis of these symptoms, however, remains undetermined. We established a mouse that harbors a mutation in Psmb8 (Psmb8-KI mouse) in order to analyze the molecular mechanisms of various symptoms in patients with a mutation in PSMB8. Psmb8-KI mouse exhibits increased sensitivity for imiquimod-induced dermatitis. The dermatitis in Psmb8-KI and wild type mouse was suppressed by the inhibition of inflammatory cytokines but neither inhibition was effective to cancel the increased sensitivity in Psmb8-KI mouse. I found that the ear of IMQ-treated KI mice expressed higher X gene expression than wild type mice. The inhibitor of X-related pathway treatment suppressed the increased swelling of the ear observed in Psmb8-KI mice.

研究分野：免疫学

キーワード：自己炎症 プロテアソーム

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

1. 研究開始当初の背景

自己炎症症候群とは、感染や自己免疫応答がないにも関わらず全身性炎症が持続あるいは繰り返す疾患として定義されている。申請者の所属講座では、日本で約 45 年前に報告されていたが原因が不明であった再発性発熱、結節性紅斑、皮下の細胞浸潤など多様な臨床症状に加えて著明な脂肪萎縮を呈する自己炎症症候群を Japanese autoinflammatory syndrome with lipodystrophy (JASL) と名付け、その原因遺伝子を探索した結果、免疫プロテアソームの構成分子である *PSMB8* のミスセンス変異 (G197V) を同定した (Kitamura et al. J Clin Invest 2011)。*PSMB8* のミスセンス変異は、同様の臨床症状を呈する Nakajo- Nishimura syndrome, JMP syndrome, CANDIE syndrome でも発見され、免疫プロテアソームの機能異常に起因する自己炎症性疾患の疾患概念が確立しつつある。しかし、それらの疾患が免疫プロテアソームの機能破綻にはじまりどのような過程を経て引き起こされているかの分子機構は解明されていなかった。

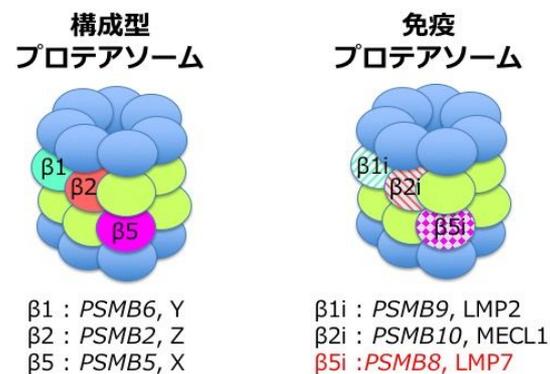
2. 研究の目的

本研究では *PSMB8* のミスセンス変異が免疫プロテアソームの機能を低下させ炎症応答を誘導している分子機構を解明することで、免疫プロテアソームによるヒト免疫システムの制御機構を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

プロテアソームはユビキチンにより標識されたタンパク質を分解し、細胞周期制御、免疫応答など細胞中の様々な働きに関わっている。構成型プロテアソームの 20S は、1~7 の 7 分子による鎖と、1~7 の 7 分子による鎖が積み重なった筒状構造をしており、未成熟 20S から各サブユニットのプロペプチドが切断され、1、2、5 がそれぞれカスパーゼ様、トリプシン様、キモトリプシン様活性を発揮する成熟型 20S となる。一方、免疫プロテアソームはウイルス感染などに

図 1 プロテアソーム



応答して産生される IFN- γ によって誘導されるプロテアソームとして報告され、20S において 1 は 1i、2 は 2i、5 は 5i (*PSMB8*) に置換される (図 1)。免疫プロテアソームの組み立てられ方は段階的で、鎖に 1i、2i、3、4 の順番で結合し中間体を形成する。5i は (以下 *PSMB8* と示す) 1i と 2i が含まれている中間体に 5 よりも優先して組み込まれていく。申請者らは *PSMB8* が変異する JASL B リンパ球では免疫プロテアソームの分子集合が障害されることを既に見いだしている。また、JASL B リンパ球では、*PSMB8* が制御するキモトリプシン様活性のみならず、すべての活性が対照群と比較して低値を示した。*PSMB8* に変異がある JASL B リンパ球には 1i を含む分子集合中間体が蓄積しており、変異 *PSMB8* が組み込まれにくく成熟型 20S の形成が阻害されていることが推測される。しかし *PSMB8* の変異によって引き起こされる分子集合の停滞が、どのような分子機構ですべてのプロテアソーム活性を低下させ炎症応答を誘導しているかについては不明である。よって次の項目について明らかにする研究を実施した。

(1) *PSMB8* 変異によるプロテアソームの分子集合異常の分子機構について生化学的手法を用いて解明する。

構成型プロテアソームと免疫プロテアソームの他に、それぞれのプロテアソームの活性を持つサブユニット (1、2、5 と 1i、2i、*PSMB8*) が混ざり合っている Intermediate-プロテアソームが報告されている。Intermediate-プロテアソームには [1、2、*PSMB8*]、[1i、2、*PSMB8*]、[1i、2i、5] のプロテアソーム活性サブユニットの組み合わせが報告されている。構成型プロテアソームはカスパーゼ様活性が高く、免疫プロテアソームはキモトリプシン様活性が高いことが明らかになっており、Intermediate-プロテアソームもそれぞれ特徴的な活性を示している。JASL B リンパ球においてキモトリプシン様活性のみならず、すべてのプロテアソーム活性が低値を示したのは、変異 *PSMB8* が免疫プロテアソームだけでなく Intermediate-プロテアソームの分子集合にも影響をあたえているからと考えられた。

JASL および対照 B リンパ球溶解液をグリセロール密度勾配遠心後に、各フラクションをプロテアソーム構成分子に対する抗体でウエスタンブロットを行い、構成型プロテアソーム、免疫プロテアソーム、Intermediate-プロテアソームの分子集合異常について検討した。

(2) JASL の炎症応答の誘導機構について動物モデルを樹立し表現系を解析、疾患誘導実験を行なった。

Psmb8 ミスセンス変異ノックインマウスの表現系の解析を行なった。

Psmb8 ノックアウトマウスは自己炎症を自然発症しない。*Psmb8* ミスセンス変異ノックインマウスも炎症を自然発症していないようにおもわれた。そこで各種マウスにおいて炎症誘導実験を行う。JASL の特徴的な臨床症状に皮膚炎症があることから、イミキモドを皮膚（耳）に塗布することで誘導される乾癬様皮膚炎モデルを用い、各種マウスを比較する。

4. 研究成果

(1) JASL 患者から樹立した JASL B 細胞では、PSMB8 が制御するキモトリプシン様活性のみならず、すべての活性が対照群と比較して低値を示した。また免疫プロテアソームやプロテアソームサブユニットが入れ替わって集合する Intermediate-プロテアソームの分子集合が障害されていた。変異 PSMB8 はプロテアソームの分子集合中間体に組み込まれにくいために、組み込まれる前段階の分子集合中間体が蓄積し、さらに、組み込まれた変異 PSMB8 分子の成熟型への変換が障害されていた。(図 2)

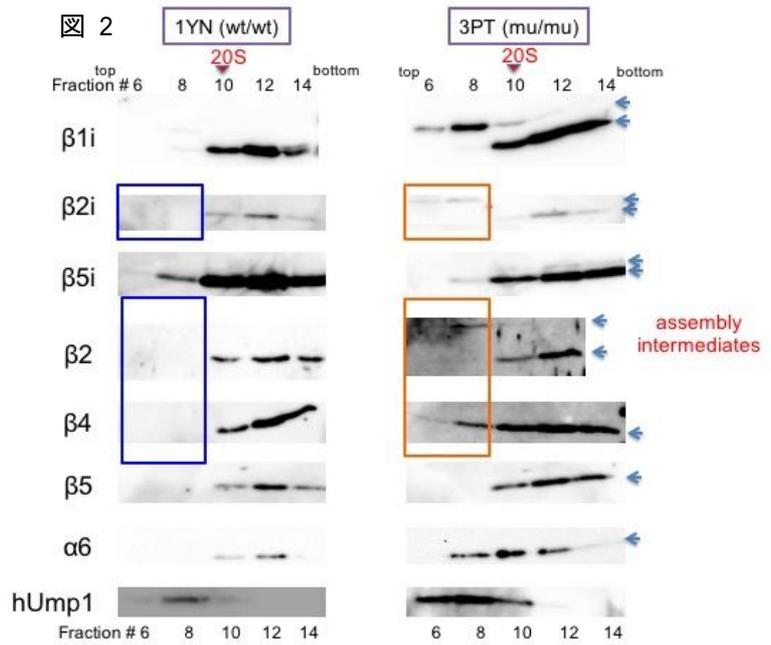
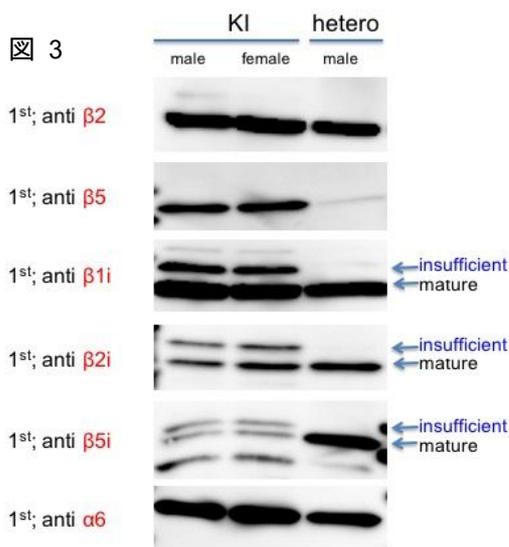


図 3



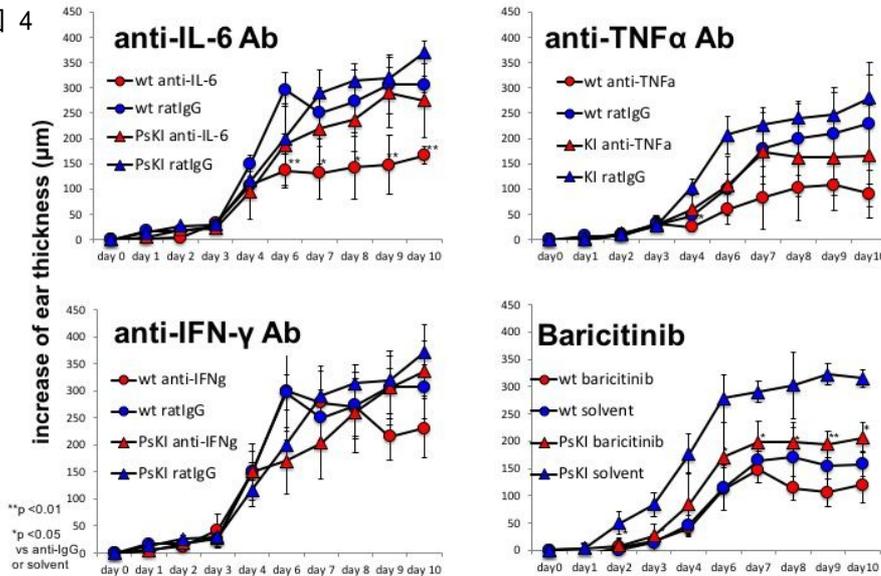
(2) JASL と同様の変異を持つ *Psmb8* ミスセンス変異ノックインマウス (*Psmb8*-KI) を樹立し解析を行ったところ、*Psmb8*-KI 細胞は JASL 患者 B 細胞と同様にプロテアソーム分子集合が障害され、分子集合中間体が蓄積し成熟型への変換が障害されていた。(図 3)

しかし、プロテアソーム活性は野生型と比較して減弱しておらず、*Psmb5* 発現が野生型と比較して著明に増強しているためにプロテアソーム活性が一部補完されていると考えられた。

そこで *Psmb8*-KI で、さらに各種免疫細胞で *Psmb5* が欠損するマウスを作製している。そのマウスは構成型プロテアソーム量が減少し、また *Psmb8* 変異の為免疫プロテアソームにも異常があり、あわせて Intermediate-プロテアソーム量も減少すると考えられる。

Psmb8-KI を SPF 環境下で飼育しているが自己炎症を発症しなかったため、イミキモド塗布乾癬様皮膚炎症誘導モデルを用い解析を行ったところ、*Psmb8*-KI は野生型と比較して炎症発症が早期でかつ増悪し、炎症部位での炎症性サイトカイン遺伝子発現増強が見られた。各種サイトカイン (IL-6、TNF-、IFN-) 阻害抗体、JAK1/2 阻害薬を用いて実験したところ、炎症は軽減するが *Psmb8*-KI の方がなおも野生型より重度であった(図 4)。

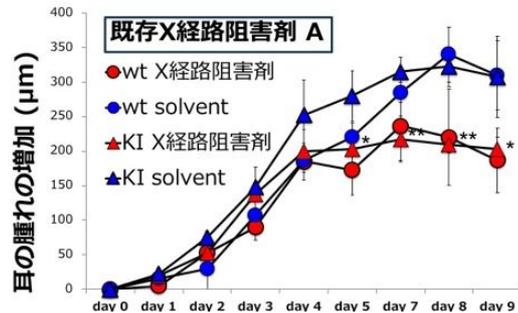
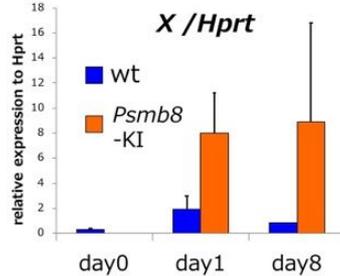
図 4



炎症部位組織にて発現増強する遺伝子を探索した結果、X 遺伝子の関与が推測され、X 関連経路阻害剤を投与したところイミキモド塗布による炎症は劇的には抑えられないものの、*Psm8*-KI と野生型の炎症の差がほとんどなくなることが見いだされた(図 5)。

現在 X 経路ノックアウト・*Psm8*-KI を作製中で、より詳細な検討を行う。

図 5



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hideki Arimochi, Yuki Sasaki, Akiko Kitamura & Koji Yasutomo. Differentiation of preadipocytes and mature adipocytes requires PSMB8. Scientific Reports Vol.6 26791-26791, 2016 DOI: 10.1038/srep26791, 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5 日
Cytokines regulation of autoinflammation caused by dysfunctions of immunoproteasomes
佐々木 由紀, 有持 秀喜, 安友 康二

第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5 日
Dysfunction of PSMB8 suppresses the maturation and anti-bacterial responses of adipocytes

有持 秀喜, 佐々木 由紀, 安友 康二

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。