

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K08880

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

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソーム関連自己炎症性症候群PRAASと同様の変異を持つPsm8ミスセンス変異ノックインマウス(Psm8-KI)を樹立し、イミキモド塗布皮膚炎症誘導モデルを用い解析を行った。Psm8-KIは野生型と比較し炎症が増悪、炎症部位でCxcl9、Cxcl10遺伝子発現が増加していた。Psm8-KI ; Cxcr3 (CXCL9、CXCL10の受容体CXCR3)欠損マウス、Psm8-KI ; Cxcl10欠損マウスにおけるイミキモド塗布実験では、Psm8-KI関連マウスと野生型の炎症の差がなくなった。この結果は、PRAASの治療法としての新しい分子標的CXCR3-CXCL10軸を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソーム関連自己炎症性症候群PRAASと同様の変異を持つPsm8ミスセンス変異ノックインマウス(Psm8-KI)を樹立し解析を行った。PRAASにおいてPSMB8以外のサブユニットの変異も報告されているがPRAASの詳しい発症機構は解明されていない。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)：Mutations in immunoproteasome subunits lead to immunoproteasome dysfunction, which causes proteasome-associated autoinflammatory syndromes (PRAAS). It remains unclear, however, how immunoproteasome dysfunction leads to inflammatory symptoms. Here, we established mice harboring a mutation in Psm8 (Psm8-KI mice). Psm8-KI mice showed higher susceptibility to imiquimod-induced skin inflammation (IMS). The skins where imiquimod was painted also expressed the Cxcl9 and Cxcl10 genes at higher levels in Psm8-KI than control mice. Deficiency in Cxcr3, the gene encoding the receptor of CXCL9 and CXCL10, in wild-type mice did not change IMS susceptibility, while deficiency in Cxcr3 in Psm8-KI mice ameliorated IMS. These findings demonstrate that this mutation in Psm8 leads to hyperactivation of the CXCR3 pathway, which is responsible for the increased susceptibility of Psm8-KI mice to IMS. These data suggest the CXCR3-CXCL10 axis as a new molecular target for treating PRAAS patients.

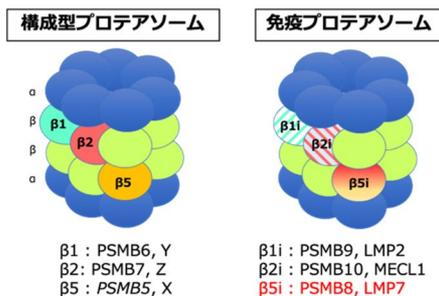
研究分野：免疫

キーワード：PRAAS PSMB8 CXCL9 CXCL10

1. 研究開始当初の背景

自己炎症症候群は明らかな感染や自己免疫応答を伴わないにもかかわらず、持続する炎症病態を特徴とする疾病と定義される。申請者の所属研究室では、自己炎症病態に脂肪萎縮を始めとする多様な症状を伴う遺伝性症候群の原因遺伝子として、免疫プロテアソームのサブユニットの一つである 5i をコードする PSMB8 遺伝子のミスセンス変異を同定した。

図1. プロテアソームの種類



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)。

PSMB8 のミスセンス変異は、Nakajo-Nishimura syndrome、JMP syndrome、CANDLE syndrome も見いだされ、近年、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は、プロテアソーム関連自己炎症性症候群(PRAAS)と定義されている。またこれまでの申請者の研究から、PSMB8 ミスセンス変異により免疫プロテアソーム機能が低下することが明らかになっている。しかし、PRAAS 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い。また一方で、Psmb8 ノックアウトマウス、および、Psmb9 (1i)、Psmb10 (2i)、Psmb8 (5i) のトリプルノックアウトマウスにおいて炎症症状は観察されていないことから、疾患と同じ変異を持ったマウスを樹立して検討を行うことが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では PSMB8 ミスセンス変異による免疫プロテアソームの機能破綻が、どのような分子基盤で PRAAS の自己炎症応答を誘導しているかについて、PRAAS の病態を詳細に再現した動物モデルを樹立する事により明らかにする事を目的とする。これまで、免疫プロテアソームは MHC クラス II への抗原提示に重要な役割を持つことが知られていたが、ヒト炎症病態との関連性は明らかではなかった。つまり PSMB8 が様々な炎症病態においてどのように機能して炎症の原因となるかという分子機構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た。

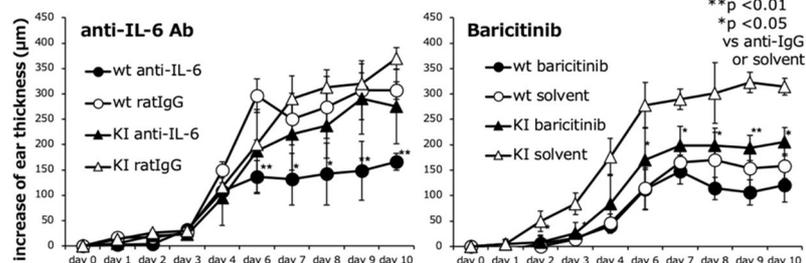
3. 研究の方法

プロテアソーム関連自己炎症性症候群 PRAAS 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 マウス)を樹立し解析を行った。Psmb8-KI マウスは炎症病態を自然発症しないことから、イミキモド塗布乾癬様皮膚炎症誘導モデルを用いた。

4. 研究成果

Psmb8-KI マウスを用い、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 マウスは野生型マウス(wt)と比較して炎症発症が早期でかつ増悪した。炎症性サイトカイン遺伝子(IL-6, TNF, IFN γ)発現も高かったため、各サイトカイン中和抗体、サイトカインのシグナル伝達を阻害する JAK1/2 阻害剤(Baricitinib)を用い

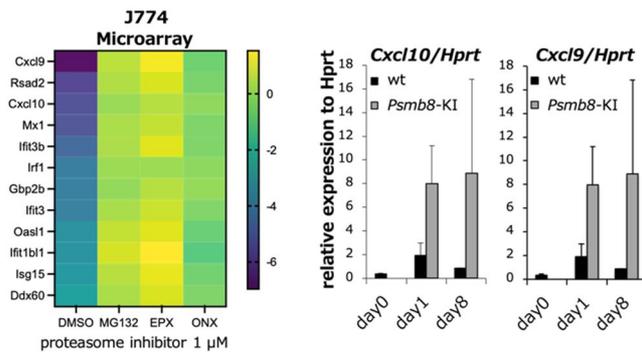
図2. Psmb8-KI マウスは、炎症性サイトカインのシグナルを阻害してもIMQ誘導性皮膚炎症を部分的にしか抑えられない



る、Psmb8-KI マウスは野生型マウス(wt)と比較して炎症発症が早期でかつ増悪した。炎症性サイトカイン遺伝子(IL-6, TNF, IFN γ)発現も高かったため、各サイトカイン中和抗体、サイトカインのシグナル伝達を阻害する JAK1/2 阻害剤(Baricitinib)を用い

で炎症が収束するかを確認したところ、ある程度炎症は抑えられるが、野生型マウスと比較して依然強い炎症を呈していた(図2)。このことから炎症性サイトカインの影響は部分的であると考えられ、ほかに炎症を惹起、増悪する因子があることが考えられた。

図3. プロテアソーム阻害剤で刺激した細胞、IMQ塗布Psmb8-KIマウスの耳組織において *Cxcl9*, *Cxcl10* mRNA が著しく上昇する

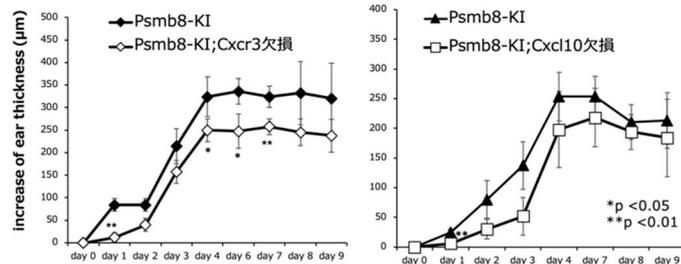


プロテアソーム阻害剤を添加したマウスマクロファージ細胞株を用いたマイクロアレイ解析の結果、プロテアソーム阻害剤で *Cxcl9*, *Cxcl10* 発現が増加していることを見出し、また Psmb8-KI マウスのイミキモド塗布炎症部位においても *Cxcl9*, *Cxcl10* 遺伝子発現が高いことを明らかにした(図3)。

CXCL9、CXCL10 の受容体である CXCR3 の炎症誘導への関与を検証したところ、Psmb8-KI マウスに CXCR3

阻害剤を投与、また Psmb8-KI; Cxcr3 欠損マウス、Psmb8-KI; Cxcl10 欠損マウスにイミキモド塗布した実験では、イミキモド塗布による炎症を完全には抑えられないものの Psmb8-KI 関連マウスと野生型マウスの炎症の差がほとんどなくなることが明らかになった(図4)。これらの結果は、PRAAS 患者を治療するための新しい分子標的として CXCR3-CXCL10 軸を示唆するものである。

図4. Psmb8-KI マウスにおいて CXCR3-CXCL10 経路を遮断すると、IMQ誘導性皮膚炎症を野生型と同程度まで抑えられる



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Yuki, Arimochi Hideki, Otsuka Kunihiro, Kondo Hiroyuki, Tsukumo Shin-ichi, Yasutomo Koji	4. 巻 7
2. 論文標題 Blockade of the CXCR3/CXCL10 axis ameliorates inflammation caused by immunoproteasome dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e152681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.152681	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuki Sasaki, Hideki Arimochi, Kunihiro Otsuka, Hiroyuki Kondo, Shin-ichi Tsukumo and Koji Yasutomo
2. 発表標題 Blockade of the CXCR3-CXCL10 axis ameliorates inflammatory responses caused by immunoproteasome dysfunctions
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------